

“Año del Buen Servicio al Ciudadano”



Universidad Nacional de Piura

Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias Biológicas

**Consortios bacterianos nitrificantes inmovilizados en filtros de
desechos agrícolas, como biorremediadores para cultivos de
Litopenaeus vannamei, en agua dulce.**

DAVID STEVEN DIOSES IMÁN

TRABAJO DE TESIS

Presentado como requisito para optar al título
profesional de Biólogo

PIURA – PERÚ

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 039-2017-FC-UNP

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada **"CONSORCIOS BACTERIANOS NITRIFICANTES INMOVILIZADOS EN FILTROS DE DESECHOS AGRÍCOLAS, COMO BIORREMEDIADORES PARA CULTIVOS DE LITOPENAEUS VANNAMEI, EN AGUA DULCE"** presentada por el señor Bachiller **DAVID STEVEN DIOSES IMÁN**, con el asesoramiento del **Mcbigo. César Augusto Torres Díaz, MSc.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

APROBADO (X)

DESAPROBADO ()

Con la mención de:

MUY BUENO

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 08 de junio del 2017.


Blgo. LUIS PANÁQUE TORRES
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS


Blgo. RONALD WILMER MARCIAL RAMOS, MSc.
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS


Dr. ELMER RONALD ARENAS RÍOS
VOCAL DE JURADO DE TESIS



**Consortios bacterianos nitrificantes inmovilizados en filtros de
desechos agrícolas, como biorremediadores para cultivos de
Litopenaeus vannamei, en agua dulce.**


**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**



Presidente: Blgo. Luis Ipanaqué Torres



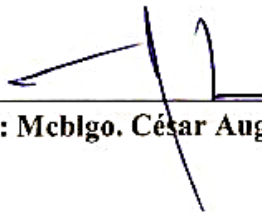
Secretario: Blgo. Ronald Wilmer Marcial Ramos



Vocal: Dr. Elmer Ronald Arenas Ríos, Ing.



Ejecutor: Br. David Steven Dioses Imán



Asesor: Mchlgo. César Augusto Torres Díaz, MSc.

Este trabajo se lo dedico a mi familia, mi padre Pablo A. Dioses Romero y hermano Alejandro S. Dioses Imán, que son la inspiración y fuerza de todo lo que realizo y los que me impulsan a siempre dar lo mejor de mí.

Gracias a ustedes y su constante apoyo, logré terminar y ver realizada mi tesis. Los quiero.

AGRADECIMIENTOS.

Un agradecimiento al Decano de la Facultad de Salud de la Universidad Nacional de Tumbes, Dr. Ezequiel Altamiro Jara, por haberme permitido utilizar las instalaciones de los laboratorios de Biología Celular, Microbiología y Biología, así como de los instrumentos, equipos y medios para el desarrollo de la tesis presentada.

Un especial agradecimiento a mi co-asesor, Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera, gracias a él, sus gestiones, enseñanzas, consejos basados en su experiencia, y las facilidades brindadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Salud de la Universidad Nacional de Tumbes, se ha podido realizar todas las actividades de investigación de la presente tesis.

Agradezco al Ing. Pesq. Christian Klaus Robles Ruiz, Gerente General de la empresa de servicios acuícolas Biodes Laboratorio Soluciones Integrales S.R.L., por el apoyo prestado para realizar los análisis moleculares para la identificación bacteriana.

Agradecimientos cordiales a la Ing. Pesq. Mervin Guevara Torres, Coordinadora del Laboratorio Costero de Tumbes (IMARPE), por permitirme realizar los análisis finales de nitrito en el laboratorio de Estudios Ambientales e Hidrológicos, en conjunto con el Blgo. Pesq. Percy A. Montero Rodríguez, al cual le agradezco profundamente por todo el apoyo en los análisis, así como la información brindada.

RESUMEN.

La intensificación de la acuicultura ha llevado al deterioro de las aguas usadas, las cuales se recargan de Nitrógenos Totales Amoniacales, en especial de amonio y nitrito, los que tienden a acumularse en los sistemas de acuicultura y se convierten en perjudiciales y hasta mortales para la población en crianza. La nitrificación microbiana fijada en biofiltros es un tema que está tomando relevancia, ya que se ha reportado que estos son ideales para tratar las emisiones que tienen bajas concentraciones de contaminantes. Para combatir esta problemática, se buscó generar un sistema de biorremediación continuo con el uso de bacterias nitrificantes fijadas en filtros de desechos agrícolas, que permita la remoción exitosa de los compuestos nitrogenados existentes en él. Para ello se aislaron 5 cepas de bacterias nitrificantes de las aguas y sedimentos del Río Tumbes, correspondientes a los géneros *Diaphorobacter*, *Sphingomonas* y *Sphingobium*, todos con reportes previos para biorremediación y de actividad nitrificante y desnitrificante. Las cepas aisladas se conformaron en consorcios bacterianos y utilizando técnicas de inmovilización, se fijaron en dos tipos de filtros de desechos orgánicos (matriz de maíz y matriz de bagazo de caña). Se realizaron 4 conjugaciones diferentes de estas cepas, y se efectuaron bioensayos en laboratorio para probar la eficacia y eficiencia en la degradación de los nitritos, obteniendo en la matriz de maíz, (Combinación 3 y 4), como las más eficaces, con una tasa de disminución del sustrato de $0,0173 \text{ ppm/hora}$ y de $0,0074 \text{ ppm/hora}$ respectivamente; y siendo la *Combinación 3* la combinación disminución promedio por día más alta, de $0,4149 \text{ ppm/día}$.

Palabras clave: biorremediación, bacterias nitrificantes, inmovilización, consorcio bacteriano, biofiltros, combinación, degradación, nitrito.

ABSTRACT.

Intensification of aquaculture has led to the deterioration of wastewater, which is recharged from Ammoniacal Total Nitrogens, especially ammonium and nitrite, which tend to accumulate in aquaculture systems and become harmful and even deadly for the aging population. Microbial nitrification fixed in biofilters is a subject that is taking on importance, since it has been reported that biofilters are ideal for treating emissions that have low concentrations of pollutants. The present paper aims to generate a continuous bioremediation system with the use of nitrifying bacteria fixed in filters of agricultural wastes, which allows the successful removal of the nitrogen compounds existing in it. For this, 5 strains of nitrifying bacteria were isolated from the waters and sediments of the Tumbes River, corresponding to the genera *Diaphorobacter*, *Sphingomonas* and *Sphingobium*, all with previous reports for bioremediation and nitrification and denitrifying activity. The isolated strains were formed in bacterial consortia, which, using immobilization techniques, were fixed in two types of organic waste filters (maize matrix and cane bagasse matrix). Four different conjugations of the isolated strains were performed, and laboratory bioassays were performed to test the effectiveness and efficiency of the nitrite degradation, obtaining two conjugations for the case of the corn matrix, Combination 3 and 4, as the most effective, with a substrate decrease rate of 0.0173 ppm/hour and 0.0074 ppm/hour respectively; and *Combination 3* being the combination of average decrease per day higher, of 0.4149 ppm/day .

Key words: bioremediation, nitrifying bacteria, immobilization, bacterial consortia, biofilters, combination, degradation, nitrite.

ÍNDICE.

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	3
	2.1. ETAPA DE DESARROLLO DEL CONSORCIO BACTERIANO.	
	2.1.1. Enriquecimiento y aislamiento de bacterias nitrificantes.....	3
	Toma de Muestras	3
	Pre-enriquecimiento y enriquecimiento	5
	Producción de BAO y BNO	5
	Aislamiento de BAOs y BNOs	5
	2.1.2. Identificación molecular mediante secuenciación del gen	
	16S rDNA	6
	2.1.3. Desarrollo de los Biofltros	8
	2.1.4. Conformación e Inmovilización del NBC en los sustratos de filtro.8	
	2.2. ETAPA DE BIOESAYOS EN LABORATORIO	9
	2.2.1. Desarrollo de los biorreactores experimentales	9
	2.2.2. Esquematización de los bioensayos realizados	9
	2.2.3. Métodos analíticos	10
	Velocidad de biodegradación de sustratos	11
III.	RESULTADOS	12
	Caracterización microbiológica y molecular a las especies integrantes de los	
	NBC	12
	Bioensayos en laboratorio	13
IV.	DISCUSIÓN	15
V.	CONCLUSIONES	17
VI.	RECOMENDACIONES	18
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
VIII.	ANEXOS	
	ANEXO 1.	24
	ANEXO 2.	26
	ANEXO 3.	28
	ANEXO 4.	30
	ANEXO 5.	36

Glosario de abreviaturas.

TAN	Total Ammonia Nitrogen - Nitrógeno Total Amoniacal
RAS	Recirculating Aquaculture Systems - Sistemas de recirculación de agua
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
BAO	Bacterias Amino-Oxidantes
BNO	Bacterias Nitrito-Oxidantes
DNA/ADN	Ácido Dexosiribonucleico
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide - Bromuro de cetiltrimetilamonio
HPLC	High-performance liquid chromatography - cromatografía de líquidos de alto rendimiento
DEPC	Diethyl pyrocarbonate – Dietil pirocarbonato
PCR	Polymerase chain reaction - Reacción en cadena de la polimerasa
NBC	Nitrify consortia bacterial – Consorcio Bacterial Nitrificante
C1	Combinación de NBC 1
C2	Combinación de NBC 2
C3	Combinación de NBC 3
C4	Combinación de NBC 4
B	Blanco de prueba en bioensayos

I. INTRODUCCIÓN.

Manju *et al.* (2013) sostienen que la intensificación de la acuicultura, ha permitido el incremento de lodos orgánicos llevando a un deterioro de las aguas usadas, así como de la calidad de los sedimentos en estas mismas, especialmente con altos Nitrógenos Totales Amoniacales (TAN, por sus siglas en inglés). El amoníaco al acumularse en los sistemas de acuicultura se convierte en perjudicial para la población en crianza, por lo que su mitigación es de principal preocupación en términos de sostenibilidad.

El amonio y su forma oxidada, los nitritos, son factores limitantes en los cultivos marinos en circuitos cerrados y deben ser retirados para mantener el medio en buenas condiciones (Puigcerver y Tort, 1997). Manju *et al.* (2009) sostienen que para un óptimo crecimiento de los langostinos, estos demandan menos del 0,1 ppm en amonio iónico (1,33 a 1,53 mg/L TAN), un pH de 0,8 y una temperatura entre 28-30 °C, ya que de otra manera lleva a un pobre consumo de balanceado, crecimiento retardado, baja sobrevivencia y alta susceptibilidad a enfermedades. Estas situaciones se han manejado tradicionalmente con recambios de agua hasta del 40%, para lograr la remoción de estos metabolitos tóxicos. Mientras se hace esto, mayores concentraciones de amonio son descargadas en las aguas receptoras, una situación que siempre conlleva a la eutrofización de las mismas.

Es por esto que la acuicultura está generando preocupación por las presiones sobre sus fuentes naturales de suministro de agua y sus impactos ambientales. Por estas circunstancias, los Sistemas de Recirculación y Reacondicionamiento del Agua (RAS, por sus siglas en inglés) deben recibir mayor atención en la acuicultura debido a que su aplicación resulta en unidades de producción más limpia (Engel, 2013).

Rejish *et al.* (2013) sostienen que la más prominente característica de cualquier RAS es el biofiltro nitrificante para prevenir la acumulación de los metabolitos como el amonio y el nitrito. Estos biofiltros son comúnmente usados para la remoción de los TAN en los RAS, en donde el crecimiento adherido de las bacterias en estos filtros ofrece gran cantidad de ventajas tales como comodidad en el manejo de las mismas, aumento de la estabilidad del proceso de carga de trabajo, y la prevención de que la población bacteriana sea lavada.

Rejish *et al.* (2013) describen que la nitrificación microbiana en biofiltros usualmente se basa en colonización natural de las bacterias nitrificantes en los sistemas de producción. Sin embargo, este método natural tiende a tomar relativamente mucho tiempo (4 a 8 semanas) para llegar a establecer una población saludable y viable tanto de las bacterias oxidantes del amonio, como también de las oxidantes del nitrito. Aún más, la población de bacterias nitrificantes es muy sensible a estrés químico y físico del medio. A razón de esto, un cultivo rápido y viable es vital para un mejor rendimiento del SAR, el cual superaría la fase inicial de latencia, y así sería usado para rápidas reactivaciones del sistema cuando exista algún tipo de inhibición del mismo.

Así tenemos que los biofiltros son ideales para tratar las emisiones que tienen bajas concentraciones de contaminantes, una situación que los métodos tradicionales de

tratamiento no logran superar. Otra de las ventajas es que los costos de instalación son bajos. La mayoría de los biofiltros se construyen a partir de materiales comunes, disponibles a nivel local, tales como madera, fibra de vidrio y tuberías plásticas. Según la cantidad de pretratamiento que requieran las emisiones, los costos operativos por lo general son bajos, costos como electricidad para operar, mano de obra a tiempo parcial para verificar el proceso, y pequeñas cantidades de macronutrientes (Cox y Russell, 2004).

Hay un considerable debate sobre cuál es la tecnología de filtro biológico más apropiada para aplicaciones acuícolas intensivas. El biofiltro ideal sería el que pudiese remover el 100% del amoníaco de la alimentación, no producir nitrito, requerir de poca superficie, usar un medio de soporte barato, no requerir presión de agua ni mantenimiento para operar, y no capturar sólidos. Desgraciadamente, no hay un biofiltro que cumpla con todas esas ideas, cada uno tiene sus propias ventajas y desventajas y áreas de mejor aplicación (Galli y Facundo, 2007).

El medio usado en los biofiltros debe ser inerte, no compresible, y no degradable biológicamente. Los más utilizados en biofiltros en acuicultura son arena, roca molida o ripio de río, algunas formas de material plástico o cerámico en forma de pequeños gránulos o grandes esferas, anillos o sillas de montar. Los biofiltros deben ser cuidadosamente diseñados para evitar la limitación por oxígeno o la carga excesiva de sólidos, DBO, o amoníaco (Galli y Facundo, 2007). Recientemente, se han realizado estudios con miras a mejorar el proceso, sustituyendo los materiales de los medios filtrantes, sustituyéndolos por medios fibrosos (Arango, 2004).

Liñán (2015) sostiene que los rellenos en un biofiltro pueden ser de naturaleza orgánica (turba, compost, astillas de madera, entre otros) o inorgánica (grava, poliestierno). La turba constituye un tipo de relleno de gran interés y ampliamente utilizado por su naturaleza orgánica y fibrosa que ofrece la ventaja doble de aportar un complemento nutritivo al *biofilm* y favorecer a una buena aireación del relleno, además, la fibra de turba de alta calidad puede garantizar hasta 10 años sin cambio de la biomasa.

Esta investigación se desarrolló con el objetivo de generar un sistema de biorremediación continuo, con el uso de bacterias nitrificantes fijadas en filtros de desechos agrícolas, que permita la remoción exitosa de los compuestos nitrogenados existentes en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*; para lo que se tuvieron los objetivos secundarios de: caracterizar molecularmente a los géneros aislados integrantes de los consorcios, y buscar la más efectiva combinación para la remoción del nitrito; determinar el tipo de desecho ideal para la confección de los biofiltros, a partir de diferentes desechos agrícolas; y evaluar la velocidad de degradación del nitrito por los consorcios de bacterias nitrogenadas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. ETAPA DE DESARROLLO DEL CONSORCIO BACTERIANO.

2.1.1 Enriquecimiento y aislamiento de bacterias nitrificantes.

Toma de Muestras.

Las muestras para el aislamiento y selección de bacterias nitrificantes se colectaron del Río Tumbes, en las orillas que circundan el pueblo de Garbanzal ($3^{\circ}36' S$ y $80^{\circ} 26' W$). (Fig. 02) La colecta de muestras se realizó abarcando un área de unos $100 m^2$ a lo largo de la ribera. Se tomaron muestras cada 20 m a lo largo de la orilla, a ambos lados del río. La toma de muestras se tomó a 5 m del borde de la orilla del río, y fue buscando aumentar las posibilidades de recuperación de las bacterias nitrificantes (Fig. 01).

La colecta de muestras se realizó siguiendo las recomendaciones y procedimientos del Manual de Laboratorio de Microbiología (Sanabria y Mercedes, 2001), en el apartado de muestras de fuentes de agua con sedimento para análisis microbiológicos. Para esto se realizó un modelo de muestreador de tipo cilíndrico con una tubería plástica de 2 m de altura y 1 pulgada de espesor, a la que se le realizaron pequeños agujeros a 5 cm de la base, para de esta manera tomar parte de la columna de agua y sustrato. Se sumergió el tubo en el agua y una vez este tocara fondo, se introdujo aproximadamente unos 3 cm dentro del fondo. Se eliminó el exceso de agua y se conservó lo obtenido en frascos plásticos estériles, previa codificación y etiquetado.

Las muestras se transportaron refrigeradas hasta las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes. Para procurar la mayor recuperación de todas las bacterias nitrificantes posibles, no se realizaron diluciones sucesivas, y se inocularon las muestras directamente en medios de cultivo de pre-enriquecimiento.

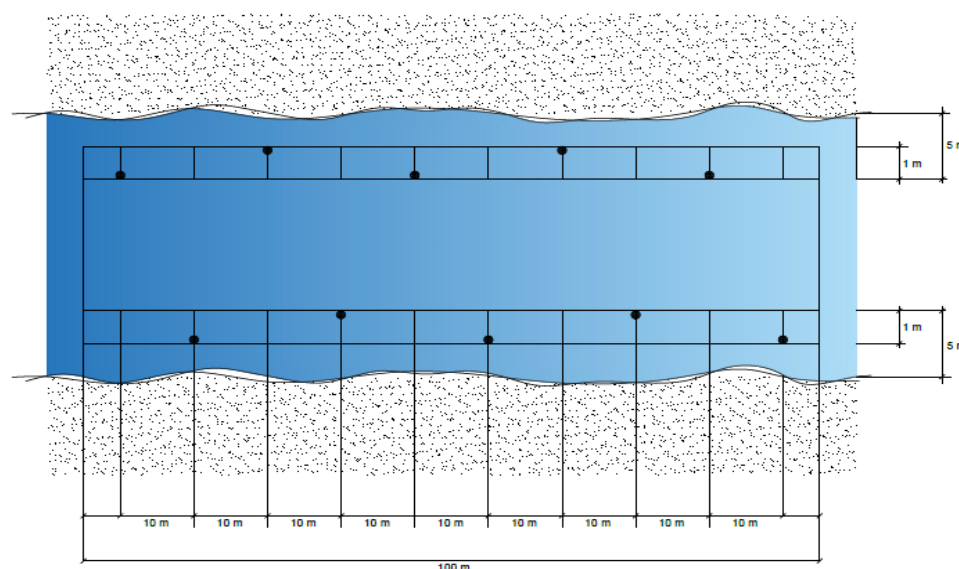


Fig. 01: Esquematización de la toma de muestras para el aislamiento de bacterias nitrificantes.



Fig. 02: Zona de colecta de muestras de agua para aislamiento de bacterias nitrificantes.

Pre-enriquecimiento y enriquecimiento

Para el pre-enriquecimiento y enriquecimiento de las bacterias, se utilizó el caldo de Winogradsky para Bacterias Nitrificantes (1980) (Anexo 1). El primer pre-enriquecimiento, se inoculó 20 mL de muestra (mezcla de sustrato y agua) en 180 mL de caldo (proporción 1/10), de los que se hicieron 3 repeticiones y se incubaron a $28^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ por 10-15 días.

Por ser bacterias, su crecimiento es lento y casi no generan turbidez; por lo que, se corroboró su desarrollo a través del viraje del colorante Rojo de Metilo 0,5%, de rojo a amarillo y luego se procedió a realizar la resiembra al medio de enriquecimiento siguiente. Estas mediciones se efectuaron después de los 10 días. En los siguientes enriquecimientos, se siguieron los mismos protocolos, teniendo en cuenta que los inóculos no solo se tomaban del caldo sino también de los fondos (recomendaciones realizadas por Winogradsky). Tanto el pre-enriquecimiento como los enriquecimientos se cultivaron en oscuridad, debido a la sensibilidad a la luz de este tipo de bacterias.

Producción de Bacterias Amonio-Oxidantes (BAO) y Bacterias Nitrito-Oxidantes (BNO).

Después del tercer enriquecimiento, las muestras estaban suficientemente enriquecidas para separar las BAO de las BNO. Se realizaron sistemas de tipo Batch, implementados en matraces Erlenmeyer (0,5 L), cada uno con 2 réplicas (BAO-1, BAO-2; BNO-1, BNO-2). La oxigenación necesaria para un óptimo crecimiento de este tipo de bacterias se mantuvo constante, siendo suministrado mediante un difusor de aire (promoviendo la formación de pequeñas burbujas y asegurando la mezcla completa al interior del sistema de cultivo), el cual se mantuvo estéril utilizando un sistema de filtración con NaCl 10%.

Los caldos utilizados para las BAO y las BNO (Anexo 1) se basaron en los trabajos Jarpa, Aguilar, Belmonte, Decap, Abarzúa y Vidal (2007). Cada matraz con medio de cultivo se inoculó con alícuotas de 1/10, se incubaron a $28^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ y en oscuridad, revisando cada 7 días el pH (que debía mantenerse entre 7,2-7,5). Todo este cultivo se mantuvo de entre 2-3 semanas, mientras se aseguraba el crecimiento total de las BAO y BNO.

Aislamiento de BAOs y BNOs.

Obtenidos los BAO y BNO, a los medios aplicados por Jarpa y otros (2007) se les agregó agar al 1,4% para obtener medios sólidos y poder tener cepas aisladas. Se realizaron aislamientos por agotamiento en estrías, 5 placas por tipo de bacterias las que se incubaron a $28-30^{\circ} \text{C}$ en oscuridad por 7 días.

Se efectuó una caracterización básica de las colonias encontradas; así como, un análisis microscópico general con Tinción Gram y determinar tipo de bacterias. La diferencia entre morfología de colonias, fue el criterio tomado para realizar el aislamiento de estas en placas distintas. De cada tipo de colonia se realizó un triplicado, siendo la siembra por estrías la técnica empleada y nuevamente se llevó a incubar a $28-30^{\circ}\text{C}$, 7 días.

A las colonias obtenidas de cada tipo se les realizó un nuevo análisis microscópico básico con Tinción Gram, para determinar si eran puras. Una vez confirmada la pureza de los cultivos, se efectuaron cultivos puros en tubos con agar inclinado, a base de los mismos medios de BAO y BNO previamente utilizados. Estos cultivos puros se llevaron a incubación por un periodo de 4 a 7 días (esperando obtener cultivos jóvenes y poder trabajar con estos) a 30° C, y luego se almacenaron a 4° C hasta su utilización en los trabajos moleculares y las inmovilizaciones propiamente dichas.

2.1.2. Identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S rDNA.

Se optó por la identificación molecular de las especies, debido a que es complicado trabajar con este tipo de bacterias, motivo por el cual se optó por seguir los protocolos a continuación mencionados:

De los cultivos puros obtenidos de las BAO y BNO respectivos, se realizaron cultivos en caldos nuevamente, los cuales se incubaron bajo las mismas condiciones de 4 a 7 días. Continuamente se realizaron siembras por difusión en placa de cada caldo incubado, las cuales, una vez incubadas, se utilizaron para cosechar células y poder efectuar los procedimientos de identificación molecular.

1. Extracción de ADN

Para las extracciones de ADN, se utilizó el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich *et al.*, 1991, adaptado para células bacterianas según Dulanto, 2013), modificado para las condiciones en las que se trabajaban.

De las placas con colonias puras, se agregaron 2 mL de agua estéril, y con un Asa de Digrafsky suavemente se empezó a desprender células del agar. Se tomó 1mL de esta suspensión bacteriana en un microtubo de 1,5 mL respectivamente y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, posteriormente se pesó la biomasa de células en una balanza analítica hasta obtener una biomasa de entre 15 a 30 mg. Este procedimiento se realizó las veces necesarias puesto que con menor cantidad de biomasa, el método no obtiene ADN de calidad.

Al microtubo con las células bacterianas se le agregó 600 µL de Solución de Extracción (CTAB 2%, Anexo 1) y con ayuda de micropistilos plásticos se homogenizó con el fin de ayudar a la lisis celular. Luego, se incubó a 75°C por 15 min en Baño María y se agitó en vórtex por 20 s. Después, se le adicionó 700 µL de cloroformo HPLC y se agitó nuevamente en vórtex por 20 s y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min.

Del sobrenadante, se transfirió 250 µL a otro microtubo que contenía previamente 100 µL de Solución CTAB 5% (Anexo 1) y 900 µL de agua estéril. Este nuevo microtubo se incubó a 75°C durante 5 min y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Inmediatamente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el ADN con 150

μL de Solución Disolvente (NaCl 1,2 M) incubándose a 75°C durante 5 min y centrifugándose a 13000 rpm durante 5 min.

Se transfirió 150 μL de la solución a un nuevo microtubo que previamente contenía 300 μL de etanol absoluto. Este, se agitó en vórtex por 20 s y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder el pellet de ADN y se agregó 500 μL de etanol al 75% para lavar el ADN. Finalmente, el ADN fue resuspendido con 200 μL de agua ultrapura DEPC y almacenado a -20°C.

2. PCR

Para amplificar la región 16S rDNA, se utilizaron los cebadores universales 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1510R (5' GGC TAC CTT GTT ACG A 3') descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Monsalud *et al.*, 2003).

El volumen final de cada reacción fue de 20 μL, 18 uL de Pre-Mezcla de trabajo (Anexo 1) y 2 μL de ADN extraído. La PCR se realizó en un Termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) y la secuencia de ciclos constó de un ciclo de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

3. Electroforesis de los productos de la PCR:

5 uL de cada producto de amplificación fueron migrados en gel de agarosa al 1 % con tampón de migración TAE 1X. La migración se realizó a 120 V durante 15 minutos. Los geles se visualizaron utilizando un transiluminador UV, y fotografiados con cámara digital. Este paso sirvió para corroborar los productos de la amplificación y de esta manera poder ejecutar la secuenciación y la identificación de las especies bacterianas aisladas.

4. Secuenciación de los productos de la PCR:

Para la secuenciación se utilizaron 10 μl de los productos obtenidos por amplificación en la PCR, los cuales fueron colocados en microtubos de 0,2 mL. Además, se prepararon en microtubos de 0,2 mL porciones de 5 uL de cada cebador universales para el gen 16S rDNA. Estas muestras, más los cebadores, fueron empacados y enviados a la empresa MacroGen de Korea, para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado.

5. Análisis computarizado:

Obtenidas las secuencias de ADN de cada producto amplificado, éstas fueron alineadas con el software libre MEGA 7 y comparadas con las secuencias de 16S rDNA que se encuentra en la base de datos de acceso público del GenBank mediante el software libre BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Todo este trabajo se realizó en la PC Lenovo Intel Core i7.

2.1.3. Desarrollo de los Biofiltros

Para confeccionar los biofiltros, se utilizaron como matrices los desechos provenientes del cultivo de maíz (coronta de maíz), y de caña de azúcar (bagazo de la caña), que son especies cultivadas regularmente en los terrenos del medio Piura.

Las muestras de desechos agrícolas, previamente secadas al sol, fueron procesadas en molino industrial, luego secadas nuevamente en estufa a 80° C por 2 días. Estos sustratos, se molieron en mortero y se tamizaron hasta obtener partículas en el rango de tamaños de 300-500 µm y 500-710 µm, rangos recomendados por Manju y otros (2013), con la mayor eficacia para la impregnación e inmovilización de los NBC.

Siguiendo el método propuesto por Wood y Saddler (1988) de deslignificación, los sustratos fueron tratados en una solución al 2% (w/v) que contenía H₂O₂ al 1% a un pH de 11,5. La solución se colocó sobre un agitador magnético, a una temperatura de 25 °C por 4 h, ajustando a pH constante de 11,5. La suspensión se filtró y se secó nuevamente a 80° C, y los sustratos tratados se almacenaron a 4 °C hasta su uso en los biofiltros.

2.1.4. Conformación e Inmovilización del NBC en los sustratos de filtro.

Para la conformación de los distintos Consorcio Bacterial Nitrificante (NBC, por sus siglas en inglés) a probar, y su respectiva inmovilización en las matrices previamente tratadas, se utilizaron tubos de PVC de prueba de 50 mL, los que previamente contenían 25 mL de medio de Watson (1965), modificado de acuerdo a las condiciones de este proyecto.

Se pesó 0,5 g de cada matriz y fueron introducidos en unas bolsillas de tela tipo *organza* (tela utilizada como filtros), las cuales se colocaron dentro de los tubos de PVC con el caldo de Watson, 2 por cada tubo (1g de sustrato en total). La mezcla fue inoculada con las combinaciones de las bacterias de BAO y BNO respectivos, teniendo una concentración en las alícuotas inoculada de 10⁶ células mL⁻¹, utilizando el tubo de MacFarland 0,5 como patrón.

Para realizar la comparación con MacFarland, cada cultivo puro se sembró primero en Caldos y luego en placas, las cuales sirvieron para la metodología. Se desprendieron células de las placas y se inocularon en tubos con Solución Salina 0.9%, hasta obtener la concentración celular de 10⁸ cel/mL teórica. A partir de estos tubos se realizaron las combinaciones presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Combinaciones realizadas en la conformación de cada NBC probado.

	B1	B2	B3	B4	B5
C1	1	1	1	1	1
C2	1	1	1	2	1
C3	1	1	1	1	2
C4	1	1	2	1	1

Todos los tubos de inmovilización se incubaron en oscuridad a 28° C por 7-10 días.

2.2. ETAPA DE BIOENSAYOS EN LABORATORIO

Los bioensayos se desarrollaron en baldes de plástico de 4 L de volumen, los cuales fueron aireados constantemente con difusores de aire de acuario (emulando las pozas de cultivo que utilizan aireadores, y también generando que el agua no se mantenga estática dentro del medio), en un área dispuesta por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Salud de la Universidad Nacional de Tumbes.

2.2.1. Desarrollo de los biorreactores experimentales.

Se utilizaron vasos de plástico de aproximadamente 150 mL, a los cuales se le hicieron una serie de orificios en los fondos y en los bordes, para que el agua pueda entrar y salir de los mismos, y se genere el sistema continuo que el objetivo persigue. Para que el biorreactor se mantenga en suspensión, se empleó pabilo y se sujetó de los bordes del balde.

Los biofiltros desarrollados se colocaron en el interior de estos recipientes, a manera de bolsas de té, sujetadas en el interior de los mismos con pabilo, y una vez completo el biorreactor se llevaron a la etapa de prueba.

2.2.2. Esquematización de los bioensayos realizados.

Se utilizaron un total de 30 baldes, los cuales fueron divididos en 2 grupos de 15 respectivamente, cada grupo para un tipo diferente de fuente de carbón (coronta de maíz y desechos de caña de azúcar). Se tomaron 4 baldes para cada una de las distintas combinaciones de los NBC y otro como blanco control. A este juego de 5, se le realizaron 3 repeticiones, dando el total de 15 baldes, previamente descrito para cada tipo de sustrato (Fig. 03).

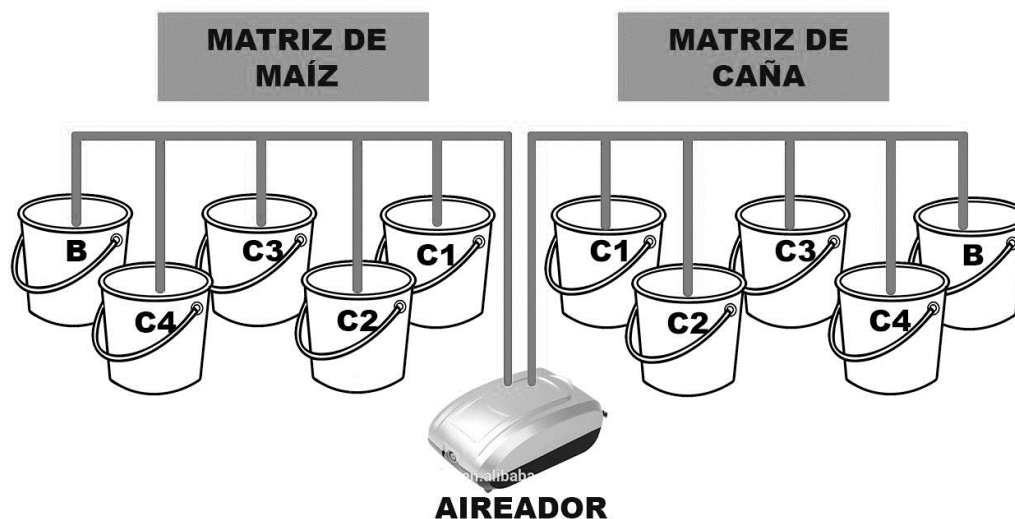


Fig. 03: Esquema de los bioensayos.

A cada recipiente se le agregó 1 mL de una solución de NaNO₂ al 0,4% lo que nos dio la concentración final de trabajo de 1 ppm, e inmediatamente se colocaron los biofiltros con las diferentes combinaciones de los NBC. Los bioensayos se realizaron siguiendo un cronograma (Anexo 2) que permitió evaluar tanto la velocidad de biodegradación del nitrito, así como la eficacia de las combinaciones de NBC propuestas, todo considerado en un tiempo máximo de vida de los langostinos (1-2 días), cuando son expuestos a altas concentraciones de esta sustancia.

2.2.3. Métodos analíticos – Determinación de Nitritos.

Se evaluó solamente la biodegradación del NO₂⁻. Se cuantificó el consumo de NO₂⁻ utilizando el método analítico basado en Strickland y Parson (1972), modificado y comprobado para agua de mar y continentales, y el trabajo se realizó en el Laboratorio de Estudios Ambientales e Hidrológicos del Laboratorio Costero de Tumbes del IMARPE (2013).

Las muestras colectadas de los bioensayos se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro con una bomba de vacío, para evitar los sólidos en suspensión que interfirieran con el análisis.

Siguiendo el protocolo, a cada 25 mL de muestra, se le agregó 0,5 ml de solución de sulfanilamida con pipeta graduada, se agitó y se dejó por espacio de 2 a 8 minutos para que ocurra la primera reacción.

Se realizó la primera lectura para determinar el error de Blanco de Turbidez, e inmediatamente después se procedió a adicionar 0,5 ml de la solución de N-(1-naftil)-etilendiamina, se agitó y se dejó por espacio de 10 minutos. Teniendo las precauciones en los tiempos de lectura recomendados por el método, se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de luz visible de la marca UNICO (Modelo 1205) a 543 nm con una celda de 10 mm, y se anotaban los datos en unidades de absorbancia (Anexo 5).

Para el cálculo de la concentración del NO₂⁻ en unidades de µM, se siguió la siguiente fórmula (Ec.1):

$$CNO_2^- = F_{cal} \times Abs$$

CNO₂⁻ : concentración de nitrito.

F_{cal} : Pendiente de la curva de calibración

Abs : Absorbancia medida en el espectrofotómetro

µmol/L o µM NO₂⁻ = micromol de nitrito por litro de muestra.

Para la transformación de µM en ppm, se utilizó la siguiente fórmula basada en la conversión de unidades (Ec. 2):

$$ppm = PM \times [\mu M] \times 10^{-3}$$

PM : peso molecular del NO₂⁻

[µM] : concentración obtenida en micromolar.

Velocidad de biodegradación de sustratos

Para calcular las velocidades de biodegradación, se realizó el cálculo de la pendiente de la línea recta mediante el cociente de las diferencias en la concentración del producto (consumo de sustratos) y el tiempo, considerándose los puntos entre los cuales se observó un cambio significativo en el comportamiento de la recta (Ec.3)

$$r_x = \Delta(X) / \Delta t$$

- r_x : velocidad máxima de consumo de sustratos tanto para cultivos de BAO y BNO ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{horas}^{-1}$ N),
 X : concentración de sustrato consumida ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ N),
 t : tiempo de operación del cultivo (horas).

III. RESULTADOS.

3.1. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR A LAS ESPECIES INTEGRANTES DE LOS NBC.

Se han aislado 5 cepas bacterianas distintas, dos pertenecientes a las BAO y las otras tres a las BNO. De acuerdo al BLAST y al GenBank, las cepas amonio-oxidantes son pertenecientes al género *Diaphorobacter*, y concuerdan con las especies de *D. nitroreducens* NR_024782 al 99% de identidad (cepa 1) y *D. polyhydroxybutyrativorans* NR_137222 al 97% de identidad (cepa 2). En el análisis microbiológico tenemos que *D. nitroreducens* son cocobacilos Gram negativos que producen colonias redondas diminutas (> 1 mm) de un color cremoso, mientras que *D. polyhydroxybutyrativorans* son cocos Gram negativos que producen colonias puntiformes con halo.

Las tres cepas pertenecientes a las bacterias nitrito-oxidantes, según BLAST y GenBank, dos pertenecen al género *Sphingomonas*, y una al género *Sphingobium*. La cepa 3 concuerda con la especie *Sphingobium suberifaciens* NR_113737 al 98% de identidad y se trata de diplococos Gram negativos que producen colonias pequeñas translúcidas. La cepa 4 es una *Sphingomonas sp.* NR_113868.1 al 94% de identidad, que no se ha podido determinar la especie, y son cocos Gram negativos que producen colonias con halo. La cepa 5 (última cepa), concuerda con la especie *Sphingomonas changbaiensis* NR_116415 al 97% de identidad, y se trata de bacilos Gram negativos que producen colonias diminutas (Secuencias genéticas en Anexo 2).

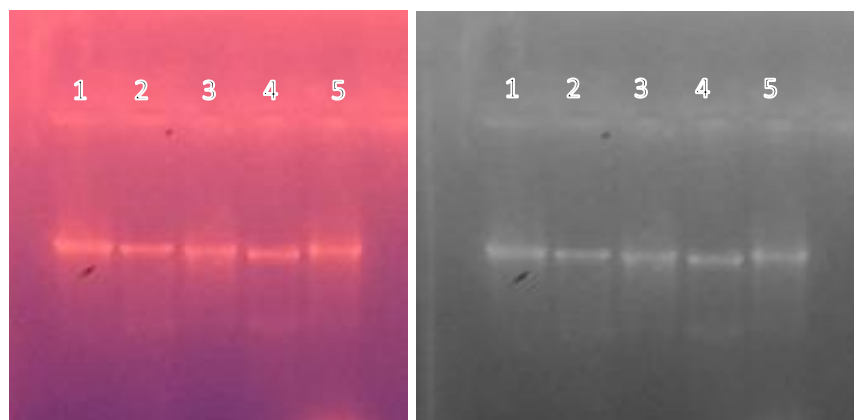


Fig. 04: Productos de amplificación de los DNA obtenidos de las cepas bacterianas aisladas utilizando los primers universales 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1510R (5' GGC TAC CTT GTT ACG A 3'), para el gen-- 16S rDNA.

3.2.BIOENSAYOS EN LABORATORIO.

3.2.1. Métodos analíticos – Determinación de Nitritos.

Se obtuvieron datos diversos entre las NBC en matriz de maíz (Tabla 2), en comparación a las NBC en matriz de caña (Tabla 3). Los datos más visibles fueron que las NBC inmovilizadas en matriz de caña, en todos los casos, agregaron nitrito al total, y si es cierto que también hubo disminución en la concentración de los nitritos al final, no sería de ayuda para pruebas en langostinos, puesto que una mayor concentración de nitritos sería letal para los especímenes (Anexo 3 – Fig. 05). A diferencia de los NBC en matriz de caña, los que fueron inmovilizados en matriz de maíz molida, en los cuales funcionaron mejor de acuerdo al objetivo, y de los cuales se obtuvieron dos combinaciones en las que los niveles de NO_2^- fueron menos a 0.8 ppm, las combinaciones C3 y C4, las cuales serían ideales para pruebas con especímenes vivos de langostinos en estanques de cultivo (Anexo 3 – Fig. 04).

La combinación más eficaz, y con los niveles más bajos encontrados de NO_2^- es la C3 de matriz de maíz, con las concentraciones de 0,7157 ppm, 0,7445 ppm y 0,7817 ppm para los caso de bioensayos (Anexo 3 – Fig. 06). La cual está conformada por el doble de concentración de la especie *Sphingomonas changbaiensis* (cepa 5). Esta tiene una disminución promedio por día de 0,4149 $\text{ppm}/\text{día}$.

3.2.2. Velocidad de biodegradación de sustratos

En cuanto a velocidad de biodegradación tenemos que, al igual que las combinaciones más eficientes para el caso de la matriz de maíz (Tabla 2), fueron las combinaciones 3 y 4; en las que obtuvimos un total de 0,0173 ppm/hora y de 0,0074 ppm/hora respectivamente, y como se puede observar, la C3 sigue siendo la combinación más eficaz incluso en velocidad de biodegradación.

Si bien es cierto que los NBC de matriz de caña no son ideales para pruebas con especímenes vivos de langostinos, en cuanto a Velocidad de Biodegradación, existieron dos combinaciones con alta eficiencia (Tabla 3) y, a diferencia del caso del maíz, fueron las combinaciones 1 y 2 en las que tenemos un total de 0,0144 ppm/hora y de 0,0064 ppm/hora respectivamente.

Tabla 2. Resultados de los bioensayos de análisis con NBC en matriz de coronta de *Zea mays*.

Matriz de coronta de maíz					
horas	C1	C2	C3	C4	Control blanco
0	0,9181	0,9714	1,1622	0,9583	1,0352
1	0,9478	1,0352	0,9701	0,8908	0,9986
3	0,9466	0,9670	0,9772	0,9701	1,0287
6	0,9289	0,9419	0,9518	0,9661	1,0110
12	1,1083	0,9946	0,8756	0,9354	1,0110
24	0,9339	0,9289	0,7473	0,7808	1,0129
<i>Velocidad biodegradación de sustratos (ppm/horas)</i>					
	0,0007	0,0018	0,0173	0,0074	

Tabla 3. Resultados de los bioensayos de análisis con NBC en matriz de bagazo de *Saccharum officinarum*.

Matriz de bagazo de caña					
horas	C1	C2	C3	C4	Control blanco
0	1,5027	1,0944	1,1040	1,2958	1,0002
1	1,3174	1,2518	1,3044	1,3156	0,9912
3	1,2651	1,2239	1,3035	1,5402	1,0250
6	1,4327	1,2617	1,2242	1,3531	1,0051
12	1,3094	1,0132	1,4061	1,3667	0,9933
24	1,1579	0,9416	1,1102	1,2601	0,9974
<i>Velocidad biodegradación de sustratos (ppm/horas)</i>					
	0,0144	0,0064	0,0003	0,0015	

IV. DISCUSIÓN

Pérez *et al.* (2011), sostienen que entre los procesos de transformación del nitrógeno están involucrados principalmente los microorganismos, con procesos metabólicos como la nitrificación y la desnitrificación. Así mismo, en investigaciones realizadas por Chakravarthy *et al.* (2011) refieren que la habilidad nitrificadora y desnitrificadora está ampliamente distribuida entre diversos géneros, más frecuentemente en los pertenecientes a los alfa y beta proteobacteria. Engel (2013) sostiene que las conversiones bioquímicas involucradas en los procesos de nitrificación y desnitrificación, la realizan bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* principalmente. Cua y Stein (2014) y Khan *et al.* (2015) sostienen que miembros de la familia Comamodaceae y Sphingomonadaceae son de gran interés para trabajos de nitrificación y desnitrificación. Las cepas aisladas y trabajadas, pertenecen a dos géneros de familias distintas, el género *Diaphorobacter* (perteneciente a la familia Comamodaceae), relacionado a la degradación del amonio, y el *Sphingomonas* (perteneciente a la familia Sphingomonadaceae), relacionado con la degradación del nitrito, a pesar que se esperaban encontrar géneros más comunes como *Nitrosomonas* o *Nitrobacter*, siendo posiblemente el primer reporte de estos géneros para la zona de Sudamérica.

Hoa *et al.* (2009) nos describen el género *Diaphorobacter*, y sostienen que fue propuesto por Khan & Hiraishi (2002) para agrupar bacterias gram-negativas, aerobias, catalasa-positivas, desnitrificantes. Li *et al.* (2015) sostienen que actualmente el género incluye tres especies reconocidas: *Diaphorobacter aerolatus* 8604-37T, *Diaphorobacter oryzae* RF3T and *Diaphorobacter nitroreducens* NA10BT. Como se indica en la descripción del género, estas especies son capaces de reducir el nitrato y en algunos casos existen reportes de reducir otros compuestos nitrogenados, como amonio y nitrito. En el trabajo desarrollado, se ha encontrado dos cepas que concuerdan molecularmente con el genoma del género *Diaphorobacter*, así como una especie identificada con el 99% de similitud, lo que corrobora los reportes para estas bacterias, al tener capacidades nitrificantes y desnitrificantes.

Khardenavis *et al.* (2007) han reportado nitrificación simultánea de amonio a altas velocidades de ocho cepas de *Diaphorobacter* que condujeron a la formación de nitrito, seguido por la desnitrificación que dio lugar a una disminución de la concentración de nitrito en la incubación inicial. Chakravarthy *et al.* (2011) compararon la actividad desnitrificante de *Diaphorobacter* y *Paracoccus*. En *Diaphorobacter* sostienen que la tasa de reducción de nitratos es alta, pero con acumulación significativa de nitritos y, aunque se informa que especies de *Diaphorobacter* también nitrifican amoníaco a nitrito, no se había agregado amonio al experimento, por lo que sugería que la acumulación de nitritos se debió a la reducción de nitratos. Para el trabajo efectuado, y al haber contado con dos cepas distintas de *Diaphorobacter*, en el caso de las que estaban en matriz de maíz, el género no ha interferido con la reducción de nitritos en el medio, e incluso se intuye una sinergia con las cepas de NBC en la reducción del nitrito, en concordancia con lo comentado con Khardenavis *et al.* (2007); a diferencia de las cepas inmovilizadas en matriz de caña, en

dónde se apreciaba un visible aumento de nitritos en todas las combinaciones, y al igual que Chakravarthy *et al.* (2011) sostienen, en el trabajo tampoco hubo fuentes inoculadas de amonio, por lo que sugiere la actividad desnitrificante reportada para *Diaphorobacter*.

Takeuchi *et al.* (2001) afirman que el género *Sphingomonas* fue propuesto por Yabuuchi (1990) para dar cabida a bacterias estrictamente aerobias, quimioheterotróficas, de pigmento amarillo, Gram-negativas, que contienen glicoesfingolípidos (GSL) como componentes de envoltura celular. Las especies del género descritas fueron inicialmente cepas de origen clínico. Wittich *et al.* (2007), sostienen que basado en análisis filogenéticos, quimiotaxonómicos y fisiológicos, el género *Sphingomonas* se ha dividido en cuatro géneros: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Sphingopyxis* (Takeuchi *et al.*, 2001). Sukweenadhi *et al.* (2015) y Du *et al.* (2015) reportan que las especies actuales del género *Sphingomonas* (ahora con más de 88 especies) se han aislado de diferentes ambientes tales como suelo, agua, aire, arena del desierto, agua dulce, sedimento, plantas, aguas residuales. En el trabajo desarrollado, hemos aislado 2 cepas pertenecientes al género *Sphingomonas*, y una cepa del género *Sphingobium*, ambas de la misma familia y como comenta Wittich *et al.* (2007), de filogenia y fisiología muy relacionada (ya que antes eran del mismo género); y en relación a lo comentado por Sukweenadhi *et al.* (2015) y por Du *et al.* (2015), son bacterias ambientales cosmopolitas, por lo que haberlas encontrado en Latinoamérica amplía más su distribución.

García *et al.* (2016) sostienen que *Sphingomonas* ha sido descrita como un grupo de bacterias fisiológicamente diversas dentro de las α -proteobacterias, por lo que han captado la atención principalmente debido a su diversidad metabólica, que incluye su capacidad para la degradación xenobiótica como una de las características más importantes, y su ubicuidad, ya que han sido aislados de muchos entornos diferentes. Cua y Stein (2014), nos dicen que el género *Sphingomonas* es un organismo modelo para estudios de biorremediación. Al trabajar con una cepa de *S. wittichii* (RW1), observaron que esta especie codifica en su genoma una nitrito-reductasa dentro de un clúster de cuatro genes. Este grupo de genes comparte la estructura y homología en la secuencia con los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, reconocidas como bacterias oxidantes de amoníaco y de nitrito respectivamente. *Sphingomonas* son poco conocidas por producir polímeros de almacenamiento de N, pero *S. wittichii* RW1 codifica una reductasa asimiladora de nitrito. En el trabajo presentado, en concordancia con lo expresado por García *et al.* (2016) y por Cua y Stein (2014), hemos corroborado la actividad biorremediadora de *Sphingomonas* y de *Sphingobium* para su reducción del nitrito. En especial se ha visualizado la eficacia, en las combinaciones 3 y 4 de estas bacterias para la matriz del maíz, en donde se ha visto una disminución promedio de 0,2962 ppm/día. Todo esto corrobora lo antes expresado por los autores sobre estos géneros y que *Sphingomonas* tiene homología con algunos genes encontrados en *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, que hubieran sido los géneros esperados originalmente, aunque se debe evaluar si es de menor o mayor eficacia con futuros trabajos.

Para estudios de nitrificación por bacterias, Jarpa *et al.* (2007) aportan que para BNO no se presenta una fase lag, por lo que una vez inoculados los cultivos y suministrado el sustrato, se inicia el consumo de nitritos y generación de nitratos, con velocidades máximas de producción de 34 y 19,3 mg.L⁻¹.día⁻¹ N. En ciclos de alimentación de mayor tiempo, el cultivo de BNO alcanza valores de 1,4 y 4,2 mg.L⁻¹.día⁻¹ (0,0583 y 0,1750 ppm.día⁻¹). La disminución de estas velocidades se explicaría por la ubicación en la fase de crecimiento de los cultivos, que se encontrarían ya en la fase de crecimiento estacionario. En sistemas de tratamiento de lodos activados Campos *et al.* (1999) obtuvieron conversiones de amonio a nitrato del 98%, con velocidades máximas de producción de nitratos de 42,5 mg.L⁻¹.día⁻¹ N, mientras que para la producción de nitritos obtuvieron velocidades máximas de producción de 24,5 mg.L⁻¹.día⁻¹ N. También se ha estudiado mediante lodos activados el efecto de aguas residuales con elevadas concentraciones de amonio y el efecto de la sal sobre el proceso de nitrificación, pudiendo oxidar 4,0 g.L⁻¹.día⁻¹ N de amoníaco a nitratos, con eficiencias de remoción del 99,5%, lo cual demuestra que esta tecnología de tratamiento opera eficientemente con altos rangos de nitrificación. De lo presentado por los autores, contrastamos que para nuestro trabajo, la Velocidad de Biodegradación que se obtuvo, fue significativamente menor a lo reportado por los autores, pero al ellos no haber utilizado combinaciones de bacterias aisladas, sino un consorcio sin identificar, no podríamos corroborar si se tratan de las mismas especies u otras más comunes como *Nitrobacter* o *Nitrosomonas*. En correlación a lo expresado por Jarpa *et al.* (2007) y Campos *et al.* (1999), podemos apreciar que mientras sí existe una disminución de los nitritos, y que a mayor la concentración del nitrito, mayor es la actividad de las bacterias nitrificantes.

En comparación con los trabajos anteriores, Manju *et al.* (2009) utilizaron cepas de laboratorios, aisladas de estanques de cultivos de penaidos en agua salada, para la elaboración de sus NBC que inmovilizaron. Ellos obtuvieron los datos en disminución de TAN y NO⁻² basados en bioensayos a diferentes salinidades (10, 20 y 30 ‰). Encontraron que la nitrificación se estableció entre las 24-48 horas y aumentó progresivamente hasta una total remoción de los TAN en ocho días. Los promedios encontrados en sus ensayos fueron para remoción de TAN de 4,0±0,53 mg.L⁻¹.día⁻¹ y 6,2±0,78 mg.L⁻¹.día⁻¹, y para el consumo de NO⁻² estuvieron entre 5,37±1,2 mg.L⁻¹.día⁻¹ y 6,89±0,9 mg.L⁻¹.día⁻¹ (0,2237 y 0,2871 ppm.hora⁻¹). Nuevamente encontramos gran diferencia entre los datos de remoción de nitritos para los NBC referenciados por los autores, a comparación de los realizados con las bacterias aisladas. Una de las posibles respuestas a esta diferencia, además que haya sido por trabajar con bacterias distintas, es que en los trabajos referenciados, al trabajar en agua salada, sus rangos para eliminar nitritos eran de días, a diferencia que los rangos que se tienen para el agua dulce en cultivo de langostinos, en dónde no puede pasar de horas la remoción, puesto que los ejemplares cultivados no lo soportarían.

Gonzáles y Pérez (2006) sostienen que el nitrógeno es introducido a los sistemas de cultivo de camarones principalmente a través de la adición de alimentos balanceados e incorporado en biomasa de camarón. Sin embargo, los sistemas de cultivo pueden ser ineficientes en transformar el nitrógeno en biomasa, por lo que tiende a convertirse en un metabolito con alta toxicidad en los estanques. Mendoza (2009) en su investigación, reporta que el uso de

bacterias nitrificantes, como biorremediadores de efluentes, tanto bacterias de los géneros *Nitrobacter* como *Nitrosomas*, es de gran importancia en la degradación de la materia orgánica presente en el agua de cultivo de camarones. Estas bacterias con ayuda del oxígeno oxidan los nutrientes, convirtiéndolos en primer lugar de amonio a nitrito y luego de nitrito a nitrato, este último menos tóxico para los organismos cultivados y además sirve como fertilizante del agua. En sus tratamientos a estanques con de tapetes de geotextil, como sustrato de fijación de microorganismos (entre ellos bacterias nitrificantes), a lo largo de todo el cultivo, fueron los que presentaron mejor calidad de agua en el cultivo y efluente, ya sea por transparencia del agua o por la menor cantidad de ion amonio y nitritos. En los trabajos de los autores, vemos la importancia de utilizar bacterias nitrificantes, y corroborando lo expresado por ellos, el uso de consorcios bacterianos inmovilizados tiende a ser una solución potencial para el problema de las sustancias nitrogenadas en el agua de los cultivos de langostinos, aunque el gran problema sigue siendo el tiempo, mientras los autores realizaron sus estudios en agua salada, en donde los langostinos tienen a resistir más tiempo y más altos niveles de nitritos, en agua dulce ocurre todo lo contrario, por lo que la *Combinación 3* de NBC propone interesantes resultados a probar con especímenes vivos como un sistema continuo de biorremediación.

V. CONCLUSIONES.

Se han aislado 5 cepas, dos pertenecientes a bacterias amonio-oxidantes, ambas del género *Diaphorobacter*: *D. nitroreducens* y *D. polyhydroxybutyrativorans*. Las otras tres cepas pertenecen a las bacterias nitrito-oxidantes, dos al género *Sphingomonas*: *S. changbaiensis*, y *S. suberifaciens*; y una al género *Sphingobium* (*S. suberifaciens*). Con estas bacterias se conformaron 4 combinaciones de Consorcios Bacterianos Nitrificantes Inmovilizadas, las que se puso a prueba su potencial nitrificante.

Las combinaciones inmovilizadas en matriz de maíz son de mayor efectividad en comparación con el bagazo de caña, pero en relación sólo a la disminución del nitrito.

Las combinaciones más eficientes en cuanto a Velocidad de Biodegradación encontradas son, para el caso de la matriz de maíz, las combinaciones 3 y 4, en las que tenemos un total de $0,0173 \text{ ppm/hora}$ y de $0,0074 \text{ ppm/hora}$ respectivamente. Las combinaciones más eficientes en cuanto a Velocidad de Biodegradación encontradas son, para el caso del bagazo de caña, son las combinaciones 1 y 2, en las que tenemos un total de $0,0144 \text{ ppm/hora}$ y de $0,0064 \text{ ppm/hora}$.

Todas las combinaciones de bacterias nitrificantes fijadas en filtros de desechos agrícolas tienen potencial para ser usadas en un sistema de biorremediación continuo, pero es la *Combinación 3* (C3) de matriz de maíz la más eficaz, y con los niveles más bajos encontrados de NO_2^- (0,7157 ppm, 0,7445 ppm y 0,7817ppm), corroborando así ser la que cuenta con el ratio más efectivo de Velocidad de Biodegradación. Esta tiene una disminución promedio por día de $0,4149 \text{ ppm/día}$, lo cual es de gran interés para estudios con especímenes vivos de langostinos.

VI. RECOMENDACIONES.

Se recomienda realizar trabajos sobre la capacidad amonio-oxidativa para los géneros de *Diaphorobacter*, y si también son tan eficaces en las condiciones de esta parte del planeta en procesos desnitrificantes, sería de mucha ayuda en la degradación y transformación del amonio en piscicultura.

Para los casos de los reportes obtenidos de *Sphingomonas* y *Sphingobium*, se recomienda realizar estudios comparativos con cepas de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, para lograr determinar si estos nuevos géneros descritos, pueden ser de mayor eficacia en biorremediación.

De las combinaciones evaluadas como de mayor eficacia, se podría emplear en futuros trabajos, especímenes vivos de langostinos para determinar si pueden llegar a ser de interés en acuicultura, combatiendo así la pérdida del producto y el cuidado en el consumo del agua.

No se han hallados reportes de trabajos con las especies encontradas en el continente sudamericano, puesto que los informes han sido en su mayoría de Japón y Korea, aunque hay reportes en Reino Unido, Alemania y Canadá. Se debería evaluar más profundamente la distribución propuesta, así como las relaciones filogenéticas de los mismos, a fin de ampliar ambos.

Para la cepa que no se ha llegado a determinar la especie (*cepa 4*) se debería realizar un estudio molecular más detallado, así como una evaluación completa de su bioquímica, para poder determinar si se trata de una nueva especie, o alguna variación fenotípica de alguna especie particular de *Sphingomonas*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Arango, A. (2004). La biofiltración, una alternativa para la potabilización del agua. *Lasallista de Investigación* 1(2), 61-66.
- Campos J, Garrido J, Méndez R, Lema, J (1999) Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. *Bioresource Technol.* 68: 141-148.
- Chakravarthy, S., Pande, S., Kapoor, A., Nerurkar, A. (2011). Comparison of denitrification between *Paracoccus sp.* and *Diaphorobacter sp.* *Appl Biochem Biotechnol* 165, 260-269.
- Cua, L. y Stein, L. (2014). Characterization of denitrifying activity by the alphaproteobacterium, *Sphingomonas wittichii* RW1. *Frontiers in Microbiology*, 404(5), 1-7.
- Cux, L. y Russell, D. (2004). Uso de biorreactores para controlar la contaminación del aire. CATC – U.S. Environmental Protection Agency, 1-27.
- Du, J., Singh H., Won K., Yang, J. Akter, S., Jin, F. y Yi, T. (2015). *Sphingomonas flavus sp. nov.* isolated from road soil. *Arch Microbiol* 197, 883-888.
- Dulanto, J.R. (2013). Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de “langostino blanco” *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Tesis de titulación, U. Mayor de San Marcos. Lima.
- Engel, R. (2013). *Sistemas de Recirculación de Agua para la Acuicultura en el estado de Hidalgo*. Ponencia presentada en Think Green 2013: “Crecimiento verde, retos y oportunidades para México”, México.
- Galli, O., Sal, F.M. (2007). *Sistemas de Recirculación y Tratamiento de agua*. Santa Ana: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos – CENADAC
- García, I., Pérez, A., González, E., Reyes, F., Santero, E. y Floriano, B. (2016). Genomic analysis of the nitrate-respiring *Sphingopyxis granuli* (formerly *Sphingomonas macrogoltabida*) strain TFA. García-Romero et al. *BMC Genomics*, 17(93), 1-15.
- González-Félix M. L. y M. Pérez-Velázquez. 2006. Un Panorama de los Presupuestos de Nitrógeno para Cultivo de Camarón. *Avances en Nutrición Acuícola VIII*. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15-17 Noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Hoa, V., Park, S., Roh, Y., Roh, D. y Rhee, S. (2009). *Diaphorobacter oryzae sp. nov.*, isolated from a thiosulfate-oxidizing enrichment culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 218-221.

- Jarpa, M., Aguilar, A., Belmonte, M., Decap, J., Abarzúa, M. y Vidal, G. (2007). Determinación de la capacidad nitrificante de un sedimento marino proveniente de un centro de cultivo de salmones. *Interciencia* 32(10), 679-685.
- Khan, S., Nagao, Y. y Hiraishi A. (2015). Nitrate removal performance of *Diaphorobacter nitroreducens* using biodegradable plastics as the source of reducing power. *AIP Conf. Proc.* 1649, 71-78.
- Khardenavis, A., Kapley, A. y Purohit, H. (2007). Simultaneous nitrification and denitrification by diverse *Diaphorobacter* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77, 403-409
- León, V. y Ledesma, J. (2013). Protocolo de análisis de nitrito en agua de mar. (Laboratorio de Estudios Ambientales e Hidrológicos). IMARPE – Sede Tumbes, Perú.
- Li, X., Han, M., Xiu, C., Ding S., Xu, L., Lin, Y., Wang, L. y Wei, G. (2015). *Diaphorobacter ruginosibacter* sp. nov., isolated from soybean root nodule, and emended description of the genus *Diaphorobacter*. *Arch Microbiol* 197, 683-692.
- Liñan, I. (2015). *Desarrollo de biofiltros de residuos orgánicos para la eliminación de contaminantes orgánicos emergentes*. (Tesis de Maestría) U. Miguél Hernández de Elche. Alicante, España.
- Manju, N.J., Deepesh, V., Achuthan, C., Rosamma, P. y Bright, L.S. (2009). Immobilization of nitrifying bacterial consortia on Wood particles for bioaugmenting nitrification in shrimp culture systems. *Aquaculture*, 65-75
- Mendoza, O. (2009). Utilización de bacterias nitrificantes como biorremediadoras del agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Tumbes – Perú. (Tesis de Doctorado) Universidad Internacional de Andalucía. La Rabida, España.
- Pérez, N. R., Peña, M. y Sanabria, J. (2011). Comunidades bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en humedales construidos. *Ingeniería y Competitividad*, 11(2), 83-92.
- Puigcerver, M. y Tort, L. (1997). Evaluación de dos medios bacterianos aceleradores del proceso de nitrificación en filtros biológicos de cultivos marinos. *Orsis* 12, 7-14.
- Rejish, V.J., Sukumaran, V., Achuthan, C., Valsamma, J., Rosamma, P. y Bright I.S. (2013). Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 74-81.

- Sanabria, J. y Mercedes, D. (2001). Manual de Laboratorio Microbiología. (Curso De Microbiología Ambiental). Universidad del Valle, Cali-Colombia.
- Strickland, J. y Parson, T. (1972). Practical Handbook of Seawater Analysis. Fisheries Board of Canada Ottawa. Bulletin 167.
- Sukweenadhi, J., Kim, Y., Kang, C., Farh, M., Nguyen N., Hoang, V. Choi, E. y Yang D. (2015). *Sphingomonas panaciterrae* sp. nov., a plant growth-promoting bacterium isolated from soil of a ginseng field. Arch Microbiol 197, 973-981.
- Takeuchi, M., Hamana, K. y Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 1405-1417.
- Watson, S. (1965). Characteristics of a marine nitrifying bacteria, *Nitrosocystis oceanus* sp. Limnology and Oceanography 10, 274-289.
- Witiich, R.M., Busse, H.J., Kämpfer, P., Tirola, M., Wieser, M., Macedo, A.J. y Abraham, W.R. (2007). *Sphingobium aromaticiconvertens* sp. nov., a xenobiotic-compound-degrading bacterium from polluted river sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 306-310.
- Wood, T., Saddler, J., 1988. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. In: Wood, W.A., Kellog, S.T. (Eds.), Methods in Enzymology. Biomass, Part A, Cellulose and hemicellulose, vol. 160. Academic press, New York.

VIII. ANEXOS.

ANEXO 1.

MEDIOS UTILIZADOS.

Medio de Winogradsky pre-enriquecimiento (1L - Agua Común)

(NH₄)₂SO₄ 1,0 g

K₂HPO₄ 1,0 g

El medio se distribuye en matraces de fondo plano, conteniendo 100 mL de medio y 0.5 g de MgCO₃ en el fondo. Se recomienda esterilizar durante 15 min a 121 °C a 1 atm, teniendo el MgCO₃ por separado del medio, para evitar pérdidas de NH₄⁺, y cuando se esté frío se vierte el medio en el matraz conteniendo el MgCO₃.

Caldo BAO, para bacterias amonio oxidantes – 1L

(NH₄)₂SO₄ 1,0 g FeSO₄ x 7H₂O 0,05 g

NaCl 2,0 g MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g

CaCO₃ 6,0 g Rojo fenol (0.5%) 0,01 mL

K₂HPO₄ 0,5 g

Medio se esteriliza a 121 °C por 15 min a 1 atm. El medio se debe alimentar en 2 ciclos, el primero de 48 días y el segundo de 113 días, con la misma proporción de los componentes descritos.

Agar BAO, para aislamiento de colonias amonio oxidantes.

Mismos componentes, con la modificación de agregar el doble de Rojo fenol 0,5%, y agregar Agar-Agar al 1,4%. Medio se esteriliza a 121 °C por 15 min a 1 atm, se vierte en placas estériles.

Caldo BNO, para bacterias nitrito oxidantes – 1L

NaNO₂ 2,0 g FeSO₄ x 7H₂O 0,00015 g

NaCl 0,5 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 2H₂O 0,0005 g

CaCO₃ 0,007 g MgSO₄ x 7H₂O 0,05 g

K₂HPO₄ 0,15 g

Medio se esteriliza a 121 °C por 15 min a 1 atm. El medio se debe alimentar en 3 ciclos, el primero de 62 días y el segundo de 71 días, y el tercero de 28 días, con la misma proporción de los componentes descritos.

Medio de Watson modificado. (1L)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13,2 g	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 2\text{H}_2\text{O}$	1 μg
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2 μg
CaCl_2	20 mg	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	20 μg
K_2HPO_4	114 mg	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	100 μg

Medio se esteriliza a 121 °C por 15 min a 1 atm.

SOLUCIONES UTILIZADAS.

SOLUCIONES para EXTRACCIÓN DE DNA.

Solución 1 – Sol. de Extracción (100 mL)

CTAB 2%		2,0 g
Tris-HCl	0,1 M	1,58 g
NaCl	1,4 M	8,18 g
EDTA	0,02 M	0,74 g

Solución 2 – Sol. De Precipitación 1. (100 mL)

CTAB 5%		5,0 g
NaCl	0,4 M	2,33 g

Solución Disolvente (100 mL)

NaCl	1,2 M	7,01 g
------	-------	--------

PREMIX para PCR. (20 μL de reacción – 18 μL de PREMIX por reacción)

Buffer Taq 1X		2,0 μL
MgCl_2	1,5 mM	1,2 μL
dNTPs (100 mM)	0,2 mM c/u.	0,16 μL (0,04 μL de cada uno)
Primers 16S	10 pmol c/cebador.	0,4 μL (0,2 μL de cada uno)
Agua Ultrapura		14,24 μL
Taq ADN polimerasa	1 U	0,2 μL .

ANEXO 2.

SECUENCIAS DE AMPLIFICACIÓN.

Cepa 1: *Diaphorobacter nitroreducens*, NR_024782 al 99%

Secuencia de 1176 pb.

TCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA
GTAATACATCGGAACGTGCCCCGATCGTGGGGGATAACGAGGCGAAAGCTTTGCTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGG
GGGATCTTCGACCTCGCGCGGACGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTG
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGGA
CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGC
CTCTTTCTAATAAAGAGGGGTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGAGGCGGTTTGTAAAGACAGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAAGTGCCTTTGTGACTGCAAGGCTGGAGTGCAGGAGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGG
AGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCGTGCAGTGCAGTCTATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGCTTCACTGACTCAGTAACGAAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCAACGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTCGATGCA
ACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTCCAGAGATGGATTTCGTGCCGAAAGGGAACTGCACACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGCCATTAGTTGCTACGAAAGG
GCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATTGGTGGGGCTACAC
ACGTCATACAATGGCTGGTACGGAGGCTT

Pertenecientes a las BAO. Colonias redondas diminutas (> 1 mm), color cremoso, cocobacilo Gram negativas.

Cepa 2: *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans*, NR_137222 al 97%.

Secuencia de 373 pb. (Reward sequence)

GGGATTTCACCTCTGACTTAAAAAACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACCGTACCGTCATGACCCCTCTTTATTAAGAGGATTTCTCTCCGAACG
AAAGCACTTTACAACCCGAAGGCCCTTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAAAATTCCCACTGC
TGCTTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGGCTTGTTAA
GCTATTATCCCACTACCTAATCT

Pertenecientes a las BAO. Colonias puntiformes, con halo. Cocos Gram negativas.

Cepa 3: *Sphingobium suberifaciens*, NR_113737 al 98%.

Secuencia de 489 pb. (Forward sequence)

AGTGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTCCCGTGTTC
AAGTTATCTAGTTTCAAAGGCAATTCCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTACCTCTGACTTGAATAACCGCTACGTGCGCTTACGCC
CAGTAATTCGAACAACGCTAGCCCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTCCCGGTACTGTC
ATTATCATCCCGGTAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCC
AATATTCCCCACTGCTGCCTCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAAGGAT
CGTCGCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACAAGCTAATCCTACGCGGGCTCATC

Pertenecientes a las NBC. Colonias pequeñas translúcidas. Diplococos Gram negativas.

Cepa 4: *Sphingomonas sp.*, NR_113868.1, al 94%

Secuencia de 694 pb.

```
CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACCGATACTGACGCTGAGGTG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAGCTAGCCGTTAGGGGGTTTACTGC
TTTGTGGCGCAACTTACGCTTTAAGCTTTCCGCCCCGGGGAATACCGGCGCAAGAATAAACTCCAAGGAATTGACGGGGGCCCGG
ACAAGCGGTGGAACATGGGGTTTAATTCCAAACAACGCGCAAAACCTTACCAGCAAGATTTATCGCCGAAGGATGAGCCCGCGTA
GGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTG
ATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCCGGGAAGATAATGACGGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGTTATTTAAGTCAGAGGT
GAAAGCCCGGAGCT
```

Pertenecientes a las NBC. Colonias con halo. Cocos Gram negativas.

Cepa 5: *Sphingomonas changbaiensis*, NR_116415 al 97%.

Secuencia de 694 pb.

```
CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACCGATACTGACGCTGAGGTG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAGCTAGCCGTTAGGGGGTTTACTGC
TTTGTGGCGCAACTTACGCTTTAAGCTTTCCGCCCCGGGGAATACCGGCGCAAGAATAAACTCCAAGGAATTGACGGGGGCCCGG
ACAAGCGGTGGAACATGGGGTTTAATTCCAAACAACGCGCAAAACCTTACCAGCAAGATTTATCGCCGAAGGATGAGCCCGCGTA
GGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTG
ATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCCGGGAAGATAATGACGGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGTTATTTAAGTCAGAGGT
GAAAGCCCGGAGCT
```

Pertenecientes a las NBC. Colonias diminutas. Bacilos Gram negativas.

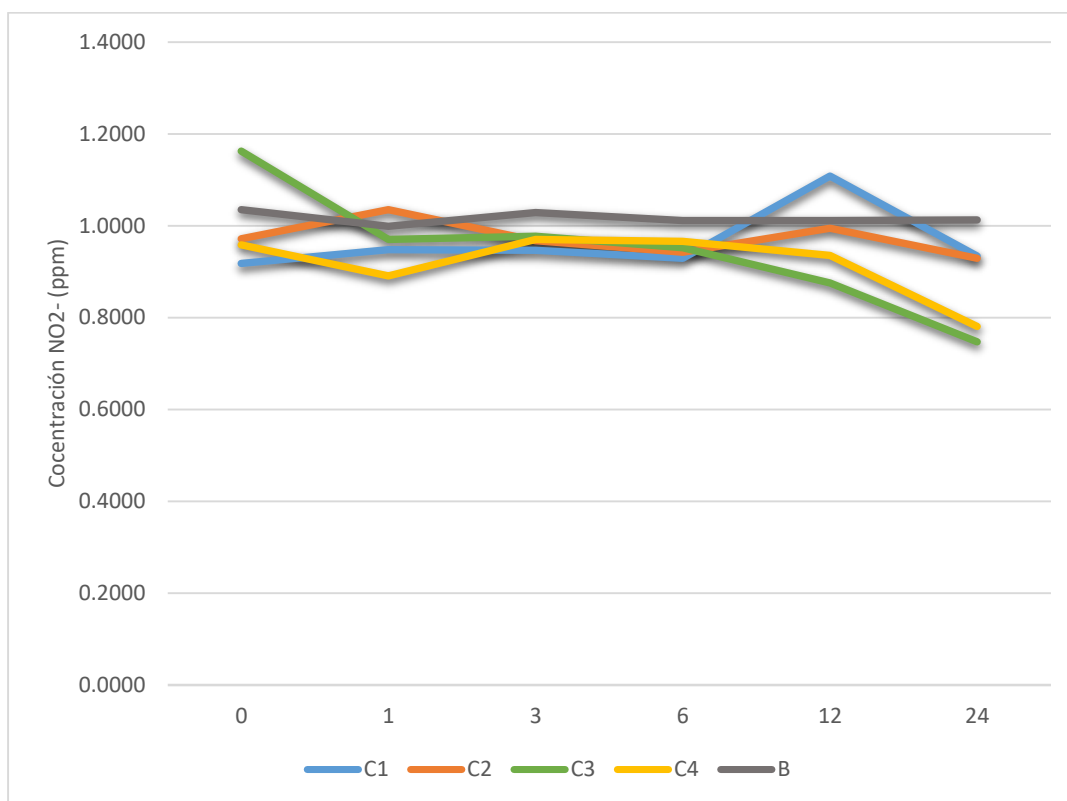


Fig. 05: Comparación entre las combinaciones trabajadas en matriz de coronta de maíz molida.

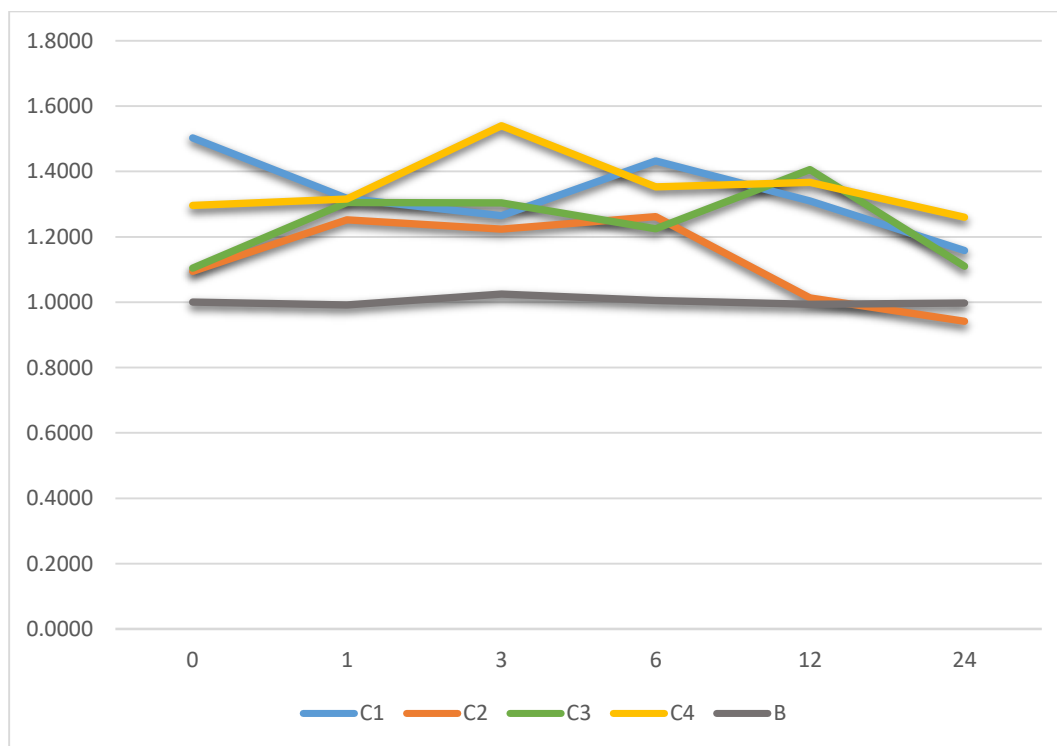


Fig. 06: Comparación entre las combinaciones trabajadas en matriz de bagazo de caña de azúcar.

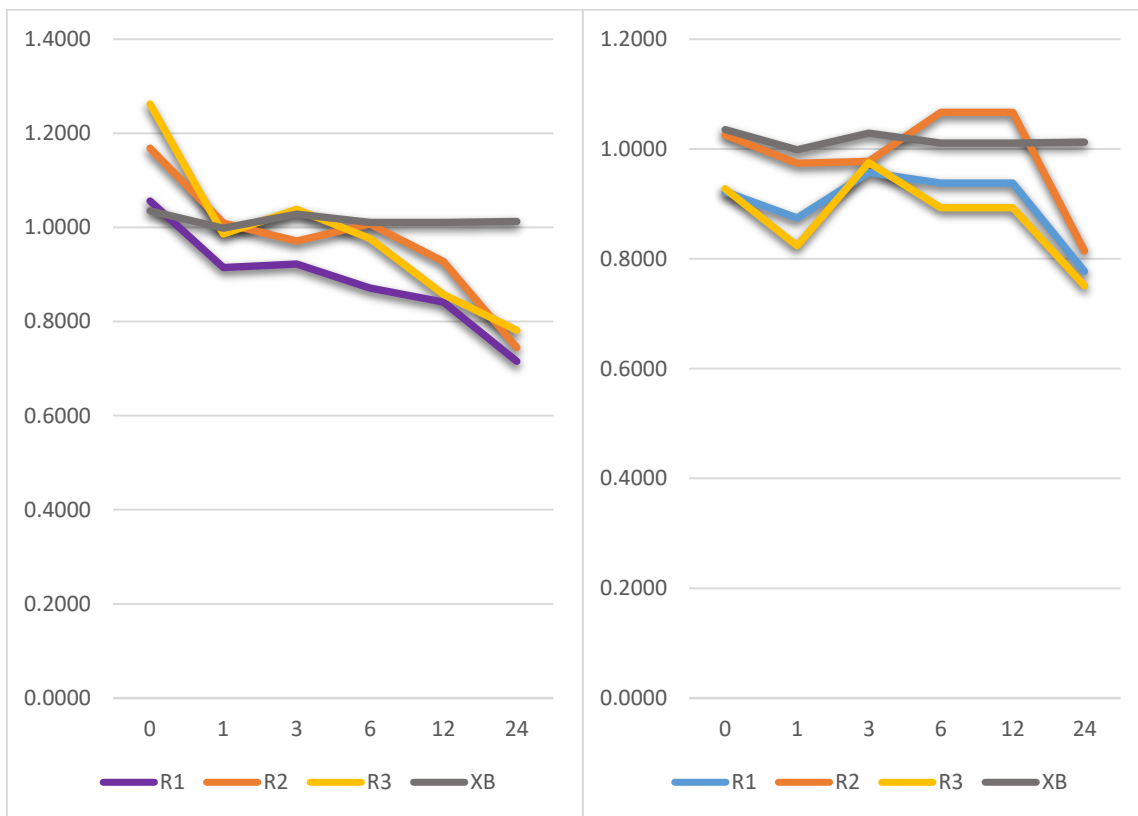


Fig. 07: Comparación entre la combinación 3 y 4 (encontradas como más efectivas) de coronta de maíz.

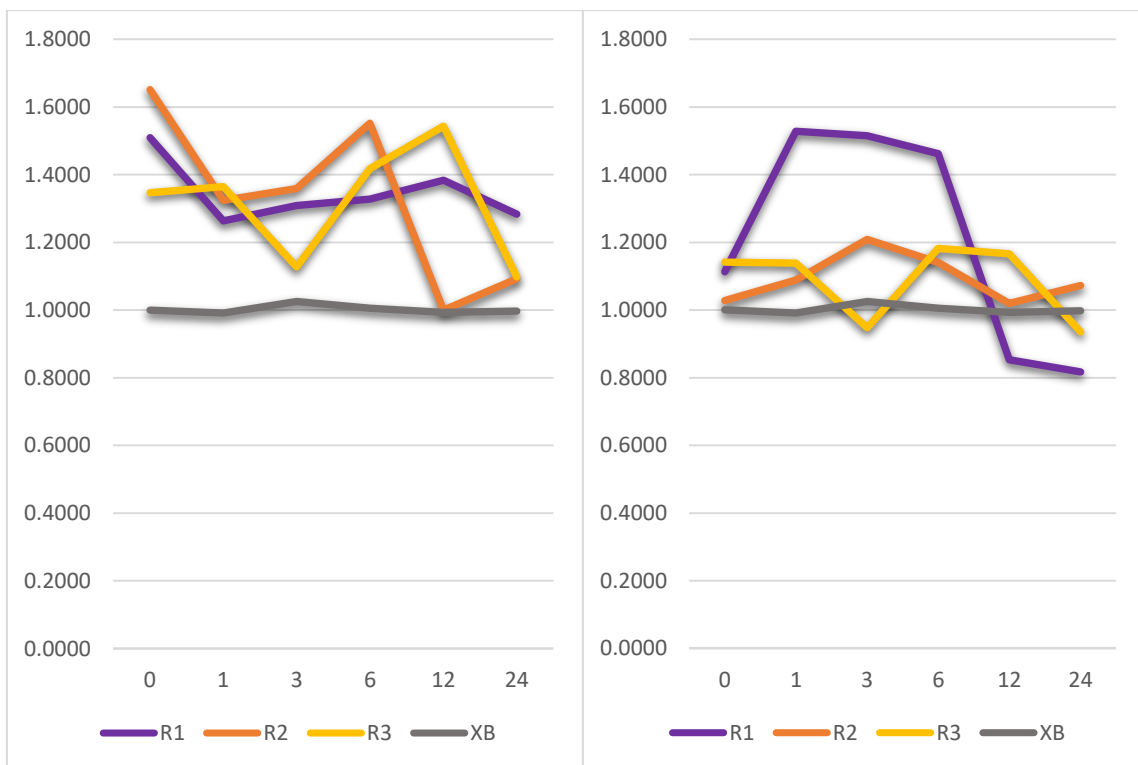


Fig. 08: Comparación entre la combinación 1 y 2 (encontradas como más efectivas) de coronta de bagazo de caña de azúcar.

REGISTRO FOTOGRÁFICO.



Fig. 08: Matrices escogidas para el desarrollo de los biofiltros. (Coronta de maíz y bagazo de caña de azúcar)

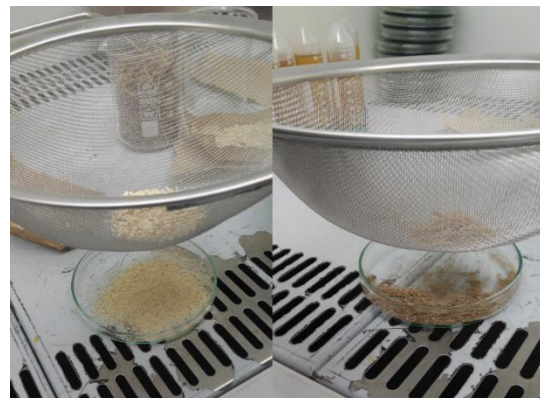


Fig. 11: Corte, molido y tamizado de las matrices luego de haber sido secadas.



Fig. 09: Secado de las matrices a 80°C.



Fig. 12: Matrices de Coronta de Maíz y de Bagazo de Caña, tamizadas y listas para tratamiento de Deslignificación.



Fig. 10: Esterilizado con Luz U.V. (dentro de la Cámara de Flujo Laminar) de las matrices y material a usar para su tratamiento.



Fig. 13: Preparación de la Solución de H₂O₂ al 1% y ajustado al pH de 11.50.



Fig. 14: Pesado previo al tratamiento con H_2O_2 1% en Agitador Magnético.

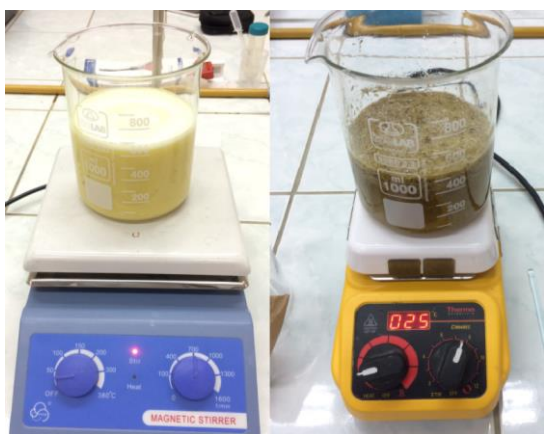


Fig. 15: Tratamiento de Desnitrificación a ambas matrices, y el colado y secado del mismo en estufa.



Fig. 16: Reactivos utilizados para los distintos medios sintéticos preparados para el pre, enriquecimiento, producción y aislamiento de las bacterias nitrificantes en los NBC evaluados.



Fig. 17: Vista de la zona de toma de muestras para el aislamiento de las bacterias nitrificantes trabajadas, y las muestras rotuladas.



Fig. 18: Caldo de Winogradsky para bacterias nitrificantes para el proceso de pre-enriquecimiento.



Fig. 19: Proceso de comprobación de existencia y crecimiento de bacterias nitrificantes.



Fig. 20: Caldos para bacterias BAO y BNO, basados en los trabajos de trabajos Jarpa, y otros (2007).



Fig. 21: Medio Caldo de Watson (1965), el cual es colocado en los tubos de PVC en donde se realizarán las futuras inmobilizaciones de NBC.



Fig. 22: Producción de BAO y BNO en sistemas en Batch, a partir del 3° enriquecimiento realizado.



Fig. 23: Visualización del crecimiento de las BAO y BNO en el sistema en Batch instalado, previo a su aislamiento en Agar.



Fig. 24: Agares BAO y BNO, basados en los Caldos de Jarpa, y otros (2007).



Fig. 25: Proceso de aislamiento de BAO y BNO en placas para obtener cultivos puros.



Fig. 26: Obtención de Cultivos Puros en agares inclinados.



Fig. 29: Cultivo de inóculos de cada caldo de BNO respectivo, para la extracción de DNA.

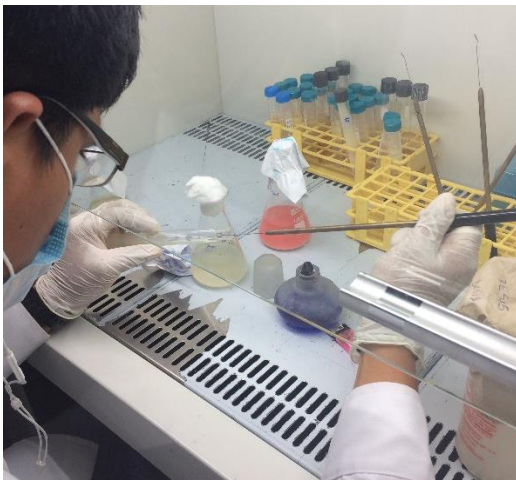


Fig. 27: Producción de cepas puras, a partir de los cultivos aislados, para uso en análisis moleculares y bioensayos.



Fig. 30: Preparado, filtrado y esterilizado de las soluciones utilizadas en la extracción de DNA.



Fig. 28: Cultivo de inóculos de cada caldo de BAO respectivo, para la extracción de DNA.



Fig. 31: Extracción de DNA de las cepas obtenidas en el proyecto.

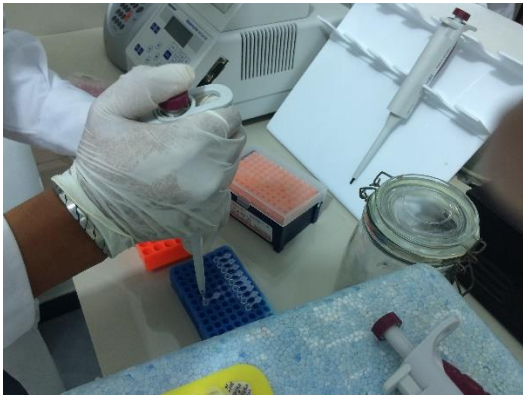


Fig. 32: Preparación del PREMIX utilizado para la PCR de las muestras.



Fig. 33: Proceso de PCR.

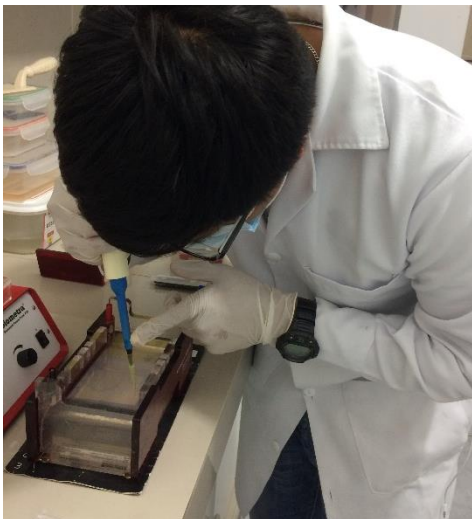


Fig. 34: Proceso de electroforesis.



Fig. 35: Confección y pesado de los biofiltros con cada matriz a probar. El de la izquierda de coronta de maíz, y el de la derecha de bagazo de caña.

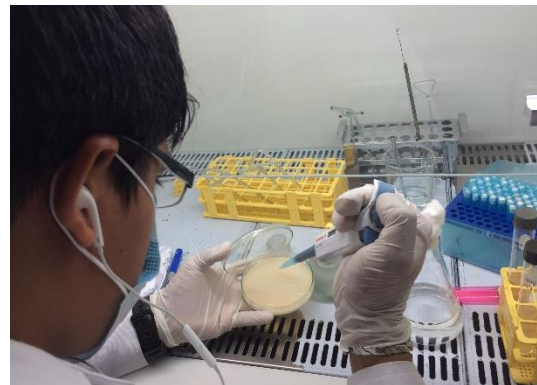


Fig. 36: Cosechado de células en SS al 0.9%, para realizar técnica de McFarland.

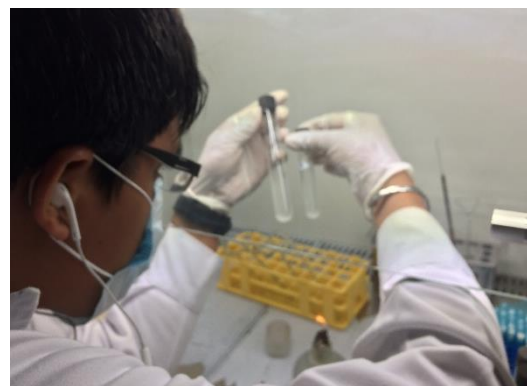


Fig. 37: Obtención de la densidad óptica requerida para las inmovilizaciones de las combinaciones de NBC trabajadas.

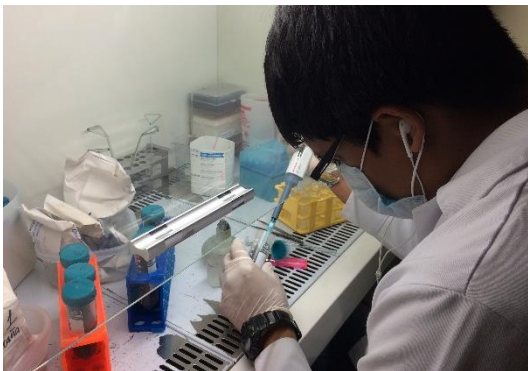


Fig. 38: Proceso de inmovilización de las diferentes combinaciones de NBC evaluadas.

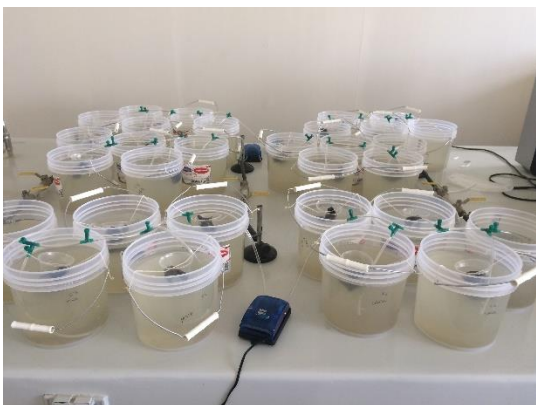


Fig. 39: Bioensayos para nitrificación.



Fig. 40: Toma de muestras en los bioensayos.



Fig. 41: Bomba de vacío utilizada para el filtrado de las muestras, previa a su análisis.



Fig. 42: Proceso de análisis de nitritos, realizado en el IMARPE-Tumbes.



Fig. 43: Análisis de nitritos en espectrofómeto molecular a 543 nm.

Tabla 4. Calculo de nitritos en NBC inmovilizados en matriz de maíz. (IMARPE – Tumbes)**CÁLCULO DE NUTRIENTES**

Estudio o monitoreo:	<i>Tesis: Consorcios bacterianos nitrificantes inmovilizados en filtros de carbón obtenidos a partir de desechos agrícolas, para la bioremediación de sistemas de cultivo de Litopenaeus vannamei, en agua dulce" (Bach. D. Dioses)</i>
Período:	<i>Dic-16</i>
Responsable:	<i>Blgo. Pesq. Percy Montero Rodríguez</i>
Fecha de análisis:	<i>21, 22 y 23/12/2016</i>

Frasco	Código	Abs_NO2 _(i)	Blanco turbidez	Abs_NO2 _(f)	NO2 (μM)	NO2 (ppm)
					Fact ₁ NO ₂ ⁻	Fact ₂ NO ₂ ⁻
					20.207	0.046
1	C1-24	0.885	0.004	0.881	17.80	0.819
2	C1-12	1.024	0.003	1.021	20.63	0.949
3	C1-06	0.931	0.005	0.926	18.71	0.861
4	C1-03	0.934	0.005	0.929	18.77	0.864
5	C1-01	0.939	0.005	0.934	18.87	0.868
6	C1-Mi	0.928	0.007	0.921	18.61	0.856
7	C1-24	1.166	0.008	1.158	23.40	1.076
8	C1-12	1.081	0.007	1.074	21.70	0.998
9	C1-06	1.11	0.009	1.101	22.25	1.023
10	C1-03	1.081	0.009	1.072	21.66	0.996
11	C1-01	1.066	0.008	1.058	21.38	0.983
12	C1-Mi	1.117	0.002	1.115	22.53	1.036
13	C1-24	0.984	0.009	0.975	19.70	0.906
14	C1-12	1.488	0.006	1.482	29.95	1.378
15	C1-06	0.978	0.007	0.971	19.62	0.903
16	C1-03	1.09	0.036	1.054	21.30	0.980
17	C1-01	1.083	0.016	1.067	21.56	0.992
18	C1-Mi	0.937	0.01	0.927	18.73	0.862
19	C2-24	0.987	0.005	0.982	19.84	0.913
20	C2-12	1.009	0.012	0.997	20.15	0.927
21	C2-06	1.006	0.004	1.002	20.25	0.931
22	C2-03	0.944	0.005	0.939	18.97	0.873
23	C2-01	0.956	0.011	0.945	19.10	0.878
24	C2-Mi	0.952	0.007	0.945	19.10	0.878
25	C2-24	1.001	0.002	0.999	20.19	0.929
26	C2-12	1.082	0.009	1.073	21.68	0.997
27	C2-06	1.1	0.011	1.089	22.01	1.012
28	C2-03	1.105	0.011	1.094	22.11	1.017
29	C2-01	0.929	0.012	0.917	18.53	0.852

30	C2-Mi	1.112	0.006	1.106	22.35	1.028
31	C2-24	1.021	0.004	1.017	20.55	0.945
32	C2-12	1.144	0.004	1.14	23.04	1.060
33	C2-06	0.955	0.006	0.949	19.18	0.882
34	C2-03	1.095	0.007	1.088	21.99	1.011
35	C2-01	1.497	0.018	1.479	29.89	1.375
36	C2-Mi	1.093	0.009	1.084	21.90	1.008
37	C3-24	0.776	0.006	0.77	15.56	0.716
38	C3-12	0.91	0.005	0.905	18.29	0.841
39	C3-06	0.942	0.005	0.937	18.93	0.871
40	C3-03	0.996	0.004	0.992	20.05	0.922
41	C3-01	0.991	0.007	0.984	19.88	0.915
42	C3-Mi	1.142	0.006	1.136	22.96	1.056
43	C3-24	0.803	0.002	0.801	16.19	0.745
44	C3-12	1.003	0.005	0.998	20.17	0.928
45	C3-06	1.089	0.005	1.084	21.90	1.008
46	C3-03	1.052	0.007	1.045	21.12	0.971
47	C3-01	1.115	0.029	1.086	21.94	1.009
48	C3-Mi	1.265	0.008	1.257	25.40	1.168
49	C3-24	0.845	0.004	0.841	16.99	0.782
50	C3-12	0.929	0.006	0.923	18.65	0.858
51	C3-06	1.06	0.009	1.051	21.24	0.977
52	C3-03	1.127	0.01	1.117	22.57	1.038
53	C3-01	1.067	0.006	1.061	21.44	0.986
54	C3-Mi	1.371	0.013	1.358	27.44	1.262
55	C4-24	0.843	0.007	0.836	16.89	0.777
56	C4-12	0.976	0.004	0.972	19.64	0.903
57	C4-06	1.017	0.008	1.009	20.39	0.938
58	C4-03	1.032	0.002	1.03	20.81	0.957
59	C4-01	0.946	0.005	0.941	19.01	0.875
60	C4-Mi	0.996	0.004	0.992	20.05	0.922
61	C4-24	0.883	0.007	0.876	17.70	0.814
62	C4-12	1.049	0.007	1.042	21.06	0.969
63	C4-06	1.156	0.008	1.148	23.20	1.067
64	C4-03	1.061	0.009	1.052	21.26	0.978
65	C4-01	1.056	0.008	1.048	21.18	0.974
66	C4-Mi	1.115	0.012	1.103	22.29	1.025
67	C4-24	0.815	0.007	0.808	16.33	0.751
68	C4-12	1.012	0.007	1.005	20.31	0.934
69	C4-06	0.989	0.028	0.961	19.42	0.893
70	C4-03	1.071	0.022	1.049	21.20	0.975
71	C4-01	0.915	0.029	0.886	17.90	0.824
72	C4-Mi	1.011	0.013	0.998	20.17	0.928
73	B-24	1.102	0.002	1.1	22.23	1.022
74	B-12	1.084	0.003	1.081	21.84	1.005
75	B-06	1.066	0.002	1.064	21.50	0.989

76	B-03	1.11	0.002	1.108	22.39	1.030
77	B-01	1.101	0.016	1.085	21.92	1.009
78	B-Mi	1.101	0.006	1.095	22.13	1.018
79	B-24	1.071	0.001	1.07	21.62	0.995
80	B-12	1.066	0.003	1.063	21.48	0.988
81	B-06	1.118	0.003	1.115	22.53	1.036
82	B-03	1.115	0.006	1.109	22.41	1.031
83	B-01	1.081	0.014	1.067	21.56	0.992
84	B-Mi	1.184	0.013	1.171	23.66	1.088
85	B-24	1.101	0.002	1.099	22.21	1.022
86	B-12	1.121	0.002	1.119	22.61	1.040
87	B-06	1.089	0.005	1.084	21.90	1.008
88	B-03	1.111	0.008	1.103	22.29	1.025
89	B-01	1.078	0.007	1.071	21.64	0.996
90	B-Mi	1.092	0.017	1.075	21.72	0.999

Analizado por: Percy Montero R.

Calculado por: Percy Montero R.

Método analítico: Espectrofotometría VIS, basado en el método de Strickland y Parson (1972).

Equipo: Espectrofotómetro UNICO 1205 VIS

Longitud de

onda: 543 nm

Fact₁

NO₂⁻ Factor de conversión de Absorbancia a Concentración

Fact₂

NO₂⁻ Factor de conversión de μM a ppm

Tabla 5. Calculo de nitritos en NBC inmovilizados en matriz de caña de azúcar. (IMARPE – Tumbes)

CÁLCULO DE NUTRIENTES

Estudio o monitoreo: *Tesis: Consorcios bacterianos nitrificantes inmovilizados en filtros de carbón obtenidos a partir de desechos agrícolas, para la bioremediación de sistemas de cultivo de Litopenaeus vannamei, en agua dulce" (Bach. D. Dioses)*

Período: *Dic-16*

Responsable: *Blgo. Pesq. Percy Montero Rodríguez*

Fecha de análisis: *21, 22 y 23/12/2016*

Frasco	Código	Abs_NO2 _(i)	Blanco turbidez	Abs_NO2 _(f)	NO2 (μM)	NO2 (ppm)
					Fact ₁ NO ₂ ⁻	Fact ₂ NO ₂ ⁻
					20.207	0.046
1	C1-24	1.385	0.004	1.381	27.91	1.284
2	C1-12	1.492	0.003	1.489	30.09	1.384
3	C1-06	1.451	0.022	1.429	28.88	1.328
4	C1-03	1.428	0.02	1.408	28.45	1.309
5	C1-01	1.377	0.018	1.359	27.46	1.263
6	C1-Mi	1.632	0.008	1.624	32.82	1.510
7	C1-24	1.182	0.007	1.175	23.74	1.092
8	C1-12	1.079	0.003	1.076	21.74	1.000
9	C1-06	1.672	0.002	1.67	33.75	1.552
10	C1-03	1.464	0.002	1.462	29.54	1.359
11	C1-01	1.427	0.002	1.425	28.79	1.325
12	C1-Mi	1.803	0.026	1.777	35.91	1.652
13	C1-24	1.186	0.005	1.181	23.86	1.098
14	C1-12	1.668	0.007	1.661	33.56	1.544
15	C1-06	1.532	0.007	1.525	30.82	1.418
16	C1-03	1.226	0.013	1.213	24.51	1.128
17	C1-01	1.477	0.009	1.468	29.66	1.365
18	C1-Mi	1.465	0.016	1.449	29.28	1.347
19	C2-24	0.884	0.005	0.879	17.76	0.817
20	C2-12	0.924	0.006	0.918	18.55	0.853
21	C2-06	1.576	0.003	1.573	31.79	1.462
22	C2-03	1.635	0.005	1.63	32.94	1.515
23	C2-01	1.651	0.007	1.644	33.22	1.528
24	C2-Mi	1.207	0.009	1.198	24.21	1.114
25	C2-24	1.16	0.006	1.154	23.32	1.073
26	C2-12	1.103	0.006	1.097	22.17	1.020
27	C2-06	1.244	0.017	1.227	24.79	1.141
28	C2-03	1.325	0.025	1.3	26.27	1.208
29	C2-01	1.201	0.03	1.171	23.66	1.088
30	C2-Mi	1.117	0.011	1.106	22.35	1.028
31	C2-24	1.013	0.007	1.006	20.33	0.935

32	C2-12	1.26	0.005	1.255	25.36	1.167
33	C2-06	1.28	0.008	1.272	25.70	1.182
34	C2-03	1.046	0.026	1.02	20.61	0.948
35	C2-01	1.241	0.016	1.225	24.75	1.139
36	C2-Mi	1.257	0.029	1.228	24.81	1.141
37	C3-24	0.936	0.003	0.933	18.85	0.867
38	C3-12	1.384	0.005	1.379	27.87	1.282
39	C3-06	1.2	0.002	1.198	24.21	1.114
40	C3-03	1.231	0.003	1.228	24.81	1.141
41	C3-01	1.67	0.011	1.659	33.52	1.542
42	C3-Mi	1.232	0.008	1.224	24.73	1.138
43	C3-24	1.286	0.005	1.281	25.89	1.191
44	C3-12	1.543	0.006	1.537	31.06	1.429
45	C3-06	1.75	0.021	1.729	34.94	1.607
46	C3-03	1.743	0.014	1.729	34.94	1.607
47	C3-01	1.573	0.017	1.556	31.44	1.446
48	C3-Mi	1.386	0.017	1.369	27.66	1.273
49	C3-24	1.376	0.007	1.369	27.66	1.273
50	C3-12	1.627	0.005	1.622	32.78	1.508
51	C3-06	1.031	0.007	1.024	20.69	0.952
52	C3-03	1.272	0.022	1.25	25.26	1.162
53	C3-01	1.01	0.015	0.995	20.11	0.925
54	C3-Mi	0.993	0.023	0.97	19.60	0.902
55	C4-24	1.303	0.003	1.3	26.27	1.208
56	C4-12	1.334	0.003	1.331	26.90	1.237
57	C4-06	1.353	0.003	1.35	27.28	1.255
58	C4-03	1.266	0.004	1.262	25.50	1.173
59	C4-01	1.217	0.009	1.208	24.41	1.123
60	C4-Mi	1.23	0.008	1.222	24.69	1.136
61	C4-24	1.244	0.011	1.233	24.92	1.146
62	C4-12	1.265	0.008	1.257	25.40	1.168
63	C4-06	1.513	0.021	1.492	30.15	1.387
64	C4-03	1.772	0.008	1.764	35.65	1.640
65	C4-01	2.005	0.023	1.982	40.05	1.842
66	C4-Mi	1.205	0.01	1.195	24.15	1.111
67	C4-24	1.55	0.016	1.534	31.00	1.426
68	C4-12	1.829	0.006	1.823	36.84	1.695
69	C4-06	1.539	0.014	1.525	30.82	1.418
70	C4-03	1.952	0.007	1.945	39.30	1.808
71	C4-01	1.077	0.021	1.056	21.34	0.982
72	C4-Mi	1.785	0.02	1.765	35.67	1.641
73	B-24	1.087	0.005	1.082	21.86	1.006
74	B-12	1.05	0.003	1.047	21.16	0.973
75	B-06	1.051	0.002	1.049	21.20	0.975
76	B-03	1.105	0.002	1.103	22.29	1.025
77	B-01	1.081	0.008	1.073	21.68	0.997

78	B-Mi	1.053	0.006	1.047	21.16	0.973
79	B-24	1.074	0.001	1.073	21.68	0.997
80	B-12	1.069	0.003	1.066	21.54	0.991
81	B-06	1.101	0.002	1.099	22.21	1.022
82	B-03	1.104	0.002	1.102	22.27	1.024
83	B-01	1.041	0.009	1.032	20.85	0.959
84	B-Mi	1.097	0.006	1.091	22.05	1.014
85	B-24	1.069	0.005	1.064	21.50	0.989
86	B-12	1.097	0.004	1.093	22.09	1.016
87	B-06	1.099	0.003	1.096	22.15	1.019
88	B-03	1.107	0.004	1.103	22.29	1.025
89	B-01	1.111	0.017	1.094	22.11	1.017
90	B-Mi	1.102	0.012	1.09	22.03	1.013

Analizado por: Percy Montero R.

Calculado por: Percy Montero R.

Método analítico: Espectrofotometría VIS, basado en el método de Strickland y Parson (1972).

Equipo: Espectrofotómetro UNICO 1205 VIS

Longitud de onda: 543 nm

Fact₁

NO₂⁻ Factor de conversión de Absorbancia a Concentración

Fact₂

NO₂⁻ Factor de conversión de µM a ppm